



中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

蜂肽經由提升胞內鈣離子濃度與 caspase-3 活性誘導
人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞凋亡及內質網壓力

**Regulation of bee venom induced apoptosis and ER stress in
human bladder cancer TSGH-8301 cells through increased
intracellular Ca²⁺ and promoted caspase-3 activation**

指導老師：葉兆雲 副教授

鍾景光 教授

Advisor : Siu-Wan Ip, Ph.D.

Jing-Gung Chung, Ph.D.

研究生：朱永麟 撰

Graduate Student : Yung-lin Chu

中華民國九十八年五月

May, 2009

中國醫藥大學營養學系碩士班

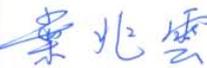
論文口試委員審定書

論文題目：

中文 蜂肽經由提升胞內鈣離子濃度與 Caspase-3 活性誘導人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞凋亡及內質網壓力

英文 Regulation of Bee venom induced apoptosis and ER stress in human bladder cancer TSGH-8301 cells through increased intracellular Ca²⁺ and promoted caspase-3 activation

本論文係朱永麟於中國醫藥大學營養學系碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及考試合格，特此證明。

委員姓名	服務機關及職稱	考試委員簽章
葉兆雲	中國醫藥大學營養學系 副教授	
鍾景光	中國醫藥大學生物科技學系 教授	
龍鳳娣	東海大學化學系 副教授	

中 華 民 國 9 8 年 5 月 2 6 日

誌謝

兩年前考進營養所之後，因為沒有老師選中我，所以我差一點就沒有指導老師了。幸好承蒙葉兆雲老師收留我，我才能安心的研讀碩士課程。之後經葉老師幫忙至鍾景光老師實驗室做實驗，兩年來接受兩位老師許多的指導，至今葉老師的耳提面命的聲音依舊環繞在我的耳邊。我原本是個毫無實驗經驗的大學生，進入了鍾老師實驗室之後才驚覺到原來世界那麼大，實驗室常常會有外國老師與學生來參訪，讓我克服了開口說英語的障礙。並且在鍾老師日復一日的努力之下，實驗室技術日新月異；實驗室楊家欣老師、鈞隆、啟誠、永鑽、孔文等學長們以及素琴、若華學姊們也努力跟上鍾老師的腳步前進，身為後輩的我就像小鴨一樣努力的追上他們的腳步，深怕自己一不小心就迷失了自我、也迷失在這個偌大的社會中，茫茫然不知所措。

此外還要感謝營養所的黃惠瑛主任、葉兆雲老師、龍鳳娣老師、唐烽堯老師、黃俊瑩老師、楊心玲老師、趙蓓敏老師、吳佳娟老師、等等其他老師們這六年來對我的照顧，另外還要感謝呂姐以及營養所其他學長姐與弟妹們之幫助。

最後當然還是要再次感謝鍾老師以及其他實驗室學長姐與學弟妹們這兩年的幫忙與協助，同學長霖、家珺、雅婷、寬穗的幫忙。學弟妹郡誌、怡廷、詩慧、敏華、靖純、郁斐、方于、進強、玲潔、凱君、怡慧等學弟妹的協助。

在這兩年中，最需要感恩的是我辛苦的母親，還有我的小妹與我的親戚們一路陪伴我並且支持我的求學之路。以及在我人生低潮的時候進入我生命的女友，感謝她還願意相信我，那種信心是支持我站起來的主要力量。最後將我在這兩年努力取得的碩士學位與營養師執照獻給從小撫養我長大的外婆黃蔡笑女士，希望您天上能收到孫子的一番心意。預祝我感謝的所有人幸福、平安。

朱永麟 謹致於

中國醫藥大學健康照護學院 營養研究所

July, 2009

總目錄

目錄.....	I
表目錄.....	VI
圖目錄.....	VII
中文摘要.....	X
英文摘要.....	XI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	3
第一節 介紹膀胱癌.....	3
一、 膀胱癌相關研究.....	4
二、 膀胱癌致病因素及機轉.....	4
三、 膀胱癌一般症狀.....	5
四、 膀胱癌的分化.....	5
五、 膀胱癌的营养照護與預防.....	7
六、 癌症與中西醫結合療法.....	8
第1節 中西醫結合化學療法.....	8
第2節 中西醫結合放射療法.....	15
第3節 中西醫結合手術療法.....	17
第4節 中西醫結合免疫療法.....	19
第5節 中醫與免疫的關係.....	22
七、 人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells)細胞型態.....	25
第二節 蜂肽 (bee venom) 之介紹.....	26
一、 蜂肽針概論.....	28
二、 蜂療簡史.....	29
三、 蜂針療法的源流.....	31

四、 蜜蜂的種類.....	33
五、 蜂肽的特性與蜂針的結構.....	35
六、 蜂肽針對各系統的影響.....	37
七、 蜂肽針療法的臨床相關研究.....	42
八、 蜂針療法.....	44
第三節 細胞死亡.....	49
一、Caspase 家族蛋白.....	49
二、粒線體相關路徑.....	50
三、內質網壓力.....	54
第四節 鈣離子訊息傳導與癌細胞存活.....	56
第五節 細胞週期與細胞凋亡.....	58
一、CDKs complex 與相關蛋白.....	58
二、Cyclins 與 CDKs.....	59
三、CKIs 與細胞週期.....	60
第六節 癌細胞轉移 (metastasis).....	61
第三章 研究目的.....	63
第四章 實驗設計.....	63
第五章 材料與方法.....	64
第一節 實驗材料.....	64
一、細胞株來源.....	64
二、藥品試劑.....	64
三、儀器設備與器材.....	68
第二節 實驗方法.....	68
一、Bee venom (BV)藥物配製.....	68
二、人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 細胞培養.....	68

三、TSGH-8301 cells 細胞冷凍保存與活化.....	69
四、細胞存活率 (Viability)分析.....	70
五、細胞週期 (Cell cycle)之分析.....	72
六、Caspase-3,-8,-9 活性分析.....	74
七、人類膀胱癌細胞之細胞核質濃縮現象觀察 DAPI (4-6-diamidine-2-phenylindole)螢光染色.....	75
八、DNA 彗星拖尾試驗 (Comet assay).....	76
九、粒線體膜電位 (Mitochondria membrane potential ; $\Delta\Psi_m$)	78
十、檢測細胞內鈣離子 (Ca^{2+})釋出的變化.....	80
十一、鈣離子螯合劑 (BAPTA)的檢測.....	81
十二、西方墨點法 (Western Blotting)	82
十三、免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining)	88
十四、Wound Healing Assays (細胞傷口癒合試驗)、Migration Assay (轉移試驗)、Invasion Assay (侵襲試驗)	89
十五、統計分析 (Statistics analysis)	89
第六章 實驗結果.....	90
第一節 蜂肽對人類膀胱癌細胞生長之影響.....	90
一、Viability (存活率):蜂肽對 TSGH-8301 細胞存活率之影響。.....	90
二、利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞粒線體膜電 位 ($\Delta\Psi_m$) 之影響.....	93
三、利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞週期之影響	95
四、利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞之 DNA 受 損之影響.....	97
五、蜂肽 (bee venom)對人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells) caspase-3, -8, -9 活性之探討.....	100
第二節 以西方墨點法探討蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞死亡之相	

關蛋白表現.....	104
一、探討有關細胞週期停滯 (cell cycle arrest)之相關蛋白.....	104
二、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡內質網壓力路徑 (endoplasmic reticulum-ER stress dependent apoptotic pathway) 之相關蛋白表現.....	106
三、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡粒線體路徑 (mitochondria-dependent apoptotic pathway)之相關蛋白表現...	108
四、探討蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 細胞凋亡的外在路徑 (extrinsic pathway)之相關蛋白表現.....	110
五、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡之 caspase 家族相關 蛋白表現.....	112
第三節 探討蜂肽對 TSGH-8301 細胞凋亡是否與細胞胞內鈣離子濃 度影響.....	113
一、蜂肽 (bee venom)對人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells) 鈣 離子釋放 (calcium release)之探討.....	113
二、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內鈣離 子濃度之改變.....	115
三、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內存活 率之改變.....	117
四、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內粒線 體膜電位 ($\Delta\Psi_m$)之改變.....	118
五、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內相關 蛋白之改變.....	119
第四節 利用免疫螢光染色法 (Immunofluorescence Staining)探討蜂 肽對 TSGH-8301 cells 細胞蛋白轉位(translocation)表現.....	120

第五節 蜂肽(bee venom)對 TSGH-8301 細胞移動(migration)與細胞 侵襲(invasion)的影響.....	125
第七章 蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡之機制.....	128
第八章 研究討論.....	129
第九章 實驗結論.....	137
第十章 參考文獻.....	139



表目錄

表 1-1	2007 癌症死因排名順位.....	2
表 2-1-1	膀胱癌之期別系統 (WHO).....	6
表 2-2-1	蜂肽中各種成分之應用.....	27
表 2-2-2	死亡受器與其配體以及相關連接蛋白.....	53
表 3-2-1	蜂肽濃度配製表.....	68
表 3-5-1	Cell Cycle PI 染劑配製.....	73
表 3-8-1	Lysis buffer 之配製.....	76
表 3-8-2	Alkaline buffer 之配製.....	77
表 3-8-3	Tris buffer 之配製.....	77
表 3-11-1	BSA 之配製.....	83
表 3-11-2	SDS-PAGE 下層膠 (Separation gel) 之配製及組成.....	85
表 3-11-3	SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel) 之配製及組成.....	86
表 3-11-4	Running buffer (1.5M Tris-HCl, pH=8.8)	86
表 3-11-5	Stacking buffer (0.5M Tris-HCl, pH=6.8)	86
表 3-11-6	電泳緩衝液 (running buffer) 之組成.....	87
表 3-11-7	轉印緩衝液 (transfer buffer) 之組成.....	87
表 3-11-8	PBS-tween 20 (PBST) 之組成.....	87

圖目錄

圖 2-1 台中榮總泌尿道癌症病患之分布百分比.....	3
圖 2-2 不同時期膀胱癌之分類.....	6
圖 2-3 TSGH-8301 細胞型態.....	25
圖 2-4 粒線體 MPTP 組成結構示意圖.....	51
圖 2-5 粒線體在細胞凋亡路徑中扮演的角色.....	52
圖 2-6 內質網壓力下，UPR 相關訊息傳導路徑.....	55
圖 2-7 胞內鈣離子與細胞死亡之關係圖.....	56
圖 2-8 鈣離子對細胞週期相關蛋白的影響.....	57
圖 2-9 癌細胞轉移過程圖.....	61
圖 4-1 檢測蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞凋亡實驗設計.....	63
圖 5-1 流式細胞儀存活率分析圖.....	71
圖 5-2 流式細胞儀細胞週期分析圖.....	72
圖 5-3 流式細胞儀 caspase-3 分析圖.....	74
圖 5-4 DAPI 結構圖.....	75
圖 5-5 流式細胞儀偵測粒線體膜電位分析圖.....	79
圖 5-6 流式細胞儀偵測粒鈣離子濃度分析圖.....	81
圖 5-7 BSA 標準曲線分析圖.....	83
圖 6-1 不同濃度之蜂肽處理 TSGH 細胞 24、48 小時之型態變化.....	91
圖 6-2 不同濃度之蜂肽處理 TSGH 細胞 24、48 小時之存活率.....	92
圖 6-3 以 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽處理 TSGH 細胞不同時間點之粒線體膜電位 變化.....	94
圖 6-4 不同濃度的蜂肽作用 TSGH 細胞 24 小時之細胞週期.....	96
圖 6-5 以不同濃度之蜂肽作用 TSGH 細胞 24 小時彗星拖尾之現象...	98
圖 6-6 以不同濃度之蜂肽 (1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g/ml}$)作用 TSGH-8301 細胞培養 24 小時，以 DAPI 染色法觀察 DNA 受損之情況.....	99

圖 6-7 以不同濃度蜂肽處理 TSGH 細胞 24 小時之 DNA 片段化現象..	99
圖 6-8 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH 細胞不同時間點之 caspase-9 變化..	101
圖 6-9 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH 細胞不同時間點之 caspase-8 變化..	102
圖 6-10 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH 細胞不同時間點之 caspase-3 變化.....	103
圖 6-11 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之細胞週期相關蛋白變化.....	105
圖 6-12 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之內質網壓力相關蛋白變化.....	107
圖 6-13 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之粒線體路徑相關蛋白變化.....	109
圖 6-14 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之外在路徑相關蛋白變化.....	111
圖 6-15 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之 caspase 路徑相關蛋白變化.....	112
圖 6-16 以 10 µg/ml 蜂肽處理 TSGH-8301 細胞不同時間點之細胞內鈣離子濃度變化.....	114
圖 6-17 預處理 BAPTA 與蜂肽同時處理 TSGH-8301 細胞之鈣離子螢光強度變化.....	116
圖 6-18 預處理 BAPTA 對蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞存活率之影響...	117
圖 6-19 預處理 BAPTA 對蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞之粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 之影響.....	118
圖 6-20 預處理 BAPTA 對蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞 caspase 相關蛋白之影響.....	119
圖 6-21 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞經蜂肽 10 µg/ml 處理後..	121

圖 6-22 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞經蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理後 cytochrome <i>c</i> 從粒線體釋出至細胞質的情形.....	122
圖 6-23 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞預處理 BAPTA 後，減 弱蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理後蜂肽所誘導之 cytochrome <i>c</i> 的螢光強度.....	123
圖 6-24 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞預處理 BAPTA 會明顯 減弱蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 誘導之 Endo G 的螢光強度與轉位表現.....	124
圖 6-25 不同濃度蜂肽對 TSGH-301 細胞移動與轉移的影響.....	127



中文摘要

在許多研究中指出，蜂肽 (bee venom) 已經被證實有多種抑制人類癌細胞生長與誘導細胞凋亡的生物活性。然而目前還沒有研究指出蜂肽誘導人類膀胱癌 TSGH-8301 細胞走向細胞凋亡的細胞內機制。在本實驗中指出，蜂肽降低了 TSGH-8301 細胞 50 % 的存活率，且用 10 $\mu\text{g/ml}$ 的蜂肽誘導細胞死亡。我們以流式細胞儀來偵測蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞週期停滯在 G0/G1 期，上升胞內鈣離子濃度以及下降粒線體膜電位。此外還使用共軛焦顯微鏡來觀察鈣離子釋出至細胞質與 AIF, Endo G 轉位到細胞核中的現象。然後我們還用 DAPI 染色與彗星試驗以及 DNA 膠體電泳法來證實蜂肽所誘導的 DNA 降解。這些結果顯示蜂肽所產生的細胞凋亡會隨著濃度差異而改變的。本實驗指出蜂肽誘導人類膀胱癌細胞走向細胞凋亡可能是經由細胞內鈣離子濃度上升與 caspase 相關路徑。我們希望，蜂肽未來可能應用在膀胱癌的臨床治療上。

Abstract

Bee venom (BV) has been shown to have biological activities including the growth of inhibition and apoptotic induction in human tumor cells. However, there is no report to address the molecular mechanism in BV-induced intracellular Ca^{2+} release and apoptosis in human bladder cancer TSGH-8301 cells. In this study, we demonstrated that BV decreased the percentage of viable TSGH-8301 cells which were analysed by flow cytometry. Flow cytometric analysis also found that BV promoted cell cycle G0/G1 arrest, increased the level of intracellular Ca^{2+} productions and loss the level of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in TSGH-8301 cells. Immunostaining analysis showed that Ca^{2+} release, AIF and Endo G translocation into nucleus were examined by confocal microscopy. In addition, BV-induced DNA degradation were confirmed by 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, Comet assay and DNA gel electrophoresis. Western blotting indicated that BV induced active forms of caspase-3, -8, and -9, and also promoted AIF and Endo G protein levels. Therefore, we made suggested to show BV inhibited the proliferation and induced apoptosis in TSGH-8301 cells through induction of intracellular Ca^{2+} and caspase-dependent pathway. Consequently, BV can be used for clinical treatment in bladder cancer patients in the future.

第一章 前言

根據行政院衛生署的統計資料顯示，癌症一直是我國國人主要的死亡原因，民國 96 年的國人癌症死因排行中，膀胱癌為癌症死因第 15 名（表 1-1）。大多膀胱癌患者大多為男性，其中 70 歲以上好發率尤其高⁽¹⁾。大多膀胱癌患者致病原因大多是因為工業產物及人工色素傷害人體，尤其是苯胺色素工廠工人罹患膀胱癌的是一般人的 30 倍⁽²⁾。

近年來癌症的研究十分盛行，因為一般醫院對腫瘤大多是使用化學療法、放射線療法，手術切除法等，這些療法不僅會傷害癌細胞，同時也會殺害病人的正常細胞，造成病人食欲不振、掉髮、新陳代謝能力下降等副作用。在《臨床營養學》中指出，95%的癌症病患是死於營養不良：因為化學藥物療法會傷害中樞及周圍神經，造成病人食物堆積在胃袋，消化道神經受到傷害而不做正常蠕動，病人半夜會因食物無法往小腸推進而起來嘔吐直至消化道淨空，如此一來食物中營養素吸收率極低，長久自然營養不良。另外放射線治療會破壞人體免疫與代謝器官的功能，造成病人骨髓造血能力降低，免疫球蛋白濃度下降造成免疫力下降，導致其他病菌趁機造成感染或發炎的機率上升，最後引發嚴重併發症，當身體處於發炎狀態，對蛋白質的需求增加，病人又蛋白質營養不良，如此惡性循環便會造成癌症病患日漸消瘦，逐漸失去對癌症與其他疾病的抵抗力；最後再加上癌細胞生長需要大量葡萄糖與能量，當癌細胞不斷成長，周圍血管供應養分不足，癌細胞便會分泌血管新生因子 (VEGF) 促使血管長出新的分支專門供應癌細胞養分，促使癌細胞不停增值，這時候若是病人又因化療或放療所造成的營養不良，那更是屋漏偏逢連夜雨，對病人身體更是雪上加霜。這也就是我們希望在自然界中找出其他抗癌成分，能夠在不傷害病人身體的情況下，利用天然藥物治療病人。

蜂肽 (bee venom)，主要是一種蜜蜂尾部螫針粗抽物，具有多種藥理與生物活性的天然複合物質。在一些研究中證實，蜂肽有以下的功能⁽³⁾：1.減輕疼痛，2.減少過敏反應，3.抑制癌細胞增生，4.抗病毒，5.誘導癌細胞走向凋亡，6.抗發

炎反應 (風濕治療).....等等功能⁽⁴⁾。目前蜂肽對膀胱癌細胞是否有傷害以及其分子機轉並不清楚，所以本實驗想探討蜂肽如何抑制人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301 cells)增生與走向細胞凋亡的分子機轉。

表 1-1 2007 癌症死因排名順位⁽⁵⁾

癌症死亡原因	96 年(2007)死亡數	順位
肺癌	7993	1
肝癌	7809	2
結腸直腸癌	4470	3
女性乳癌	1552	4
胃癌	2474	5
口腔癌(含口咽及下咽)	2312	6
攝護腺癌	1003	7
子宮頸癌	833	8
食道癌	1438	9
胰臟癌	1354	10
非何杰金淋巴癌	1298	11
膽囊癌	1145	12
白血病	861	13
卵巢癌	405	14
膀胱癌	804	15

第二章 文獻探討

第一節、介紹膀胱癌

首先來認識膀胱，膀胱是肌肉性囊狀結構，上面連接來自兩側腎臟的輸尿管，收集腎臟排出的尿液，暫時貯積起來，當膀胱尿液達 200~300 毫升，即可生產強烈尿意，但可隨各種精神狀況及疾病而變化。膀胱癌在 2006 年衛生署癌症死因排第十五順位，即使前列腺癌近年在國內有竄升之趨勢，但膀胱癌仍是泌尿道腫瘤中最多見者。90%的膀胱癌大多屬於 (transitional cell carcinoma, TCC)，癌症有可能會發生在尿道，尿管，膀胱上，是泌尿道最嚴重的癌症⁽⁶⁾。比較特別的是，在台灣烏腳病流行區 (包括嘉義布袋、義竹；台南學甲、鹽水)的膀胱癌發生率特別高。烏腳病流行區比較盛行移行上皮癌 (transitional cell carcinoma, TCC)，以下為泌尿道癌症的區別 (圖 2-1)⁽⁷⁾。

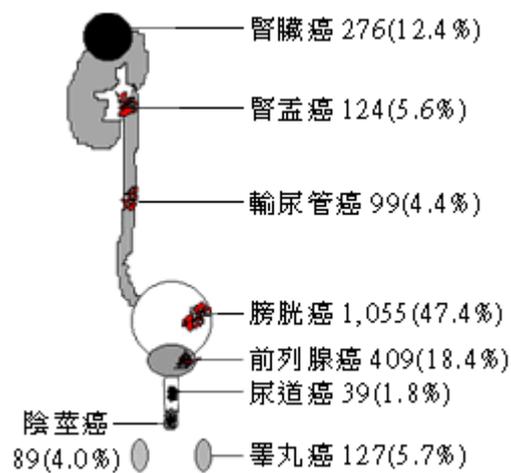


圖 2-1 台中榮總泌尿道癌症病患之分布百分比

一、膀胱癌相關研究

目前膀胱癌的研究並不多，已知有學者以免疫治療或放射線治療異體轉殖(皮下誘導 TSGH-8301 細胞)的裸鼠^(8,9)，也有突變 TSGH-8301 細胞的 p53 基因可能會誘導其細胞凋亡⁽¹⁰⁾。另外還有研究以牛樟芝 (Antrodia camphorate) 萃取物明顯抑制了 TSGH-8301 細胞的移動與轉移的能力之相關實驗⁽¹¹⁾。對於一個泌尿道具有強大致死率的癌症，從以前到如今國際期刊收錄不超過 20 篇有關 TSGH-8301 細胞的文獻，令我們對膀胱癌患者的治療深感憂心，於是本實驗期許能為膀胱癌患者找到另一道天然藥物的治療曙光。

二、膀胱癌致病因素及機轉

一般常被認為相關因子為：

- a. 染料工業 (aniline dyes, aromatic amines)、油漆工、印刷工人，經常染髮。
- b. 生活作息不正常，抽煙，香煙會使維他命 B6 (pyridoxine) 減少，導至亞硝酸胺(nitrosamines)、(2-naphthylamine)及色胺酸 (tryptophan) 等無法代謝。
- c. 血吸蟲病或結石和鱗狀細胞癌有關，而複雜性感染與膀胱癌也有關，尤其是女性。至於咖啡、茶或人工甘味劑之角色則尚未確定。
- d. 有動物實驗顯示老鼠長期大量服用一種人工甜味劑"糖精" (沙卡林/saccharin) 可導致膀胱癌，但人體尚未有相同的報告。
- e. 藥物濫用。
- f. 年齡，好發於 70 歲以上男性⁽¹²⁾。

三、 膀胱癌一般症狀

膀胱癌的最主要症狀是血尿，特別是無痛性的血尿。約 80% 的膀胱癌病人皆因血尿出現始接受檢查，血尿可以持續或反覆發生。如果年紀較大的人發現這種症狀，首先一定要考慮膀胱癌的可能性。有時可有脫落之組織碎片或肉團血塊等排出，如腫瘤侵及膀胱頸部，則會有小便困難及尿意頻繁等。

四、 膀胱癌的分化

膀胱癌細胞本身分化程度按世界衛生組織 (WHO) 決議可分為三個等級。第一級分化 (grade 1) 指大多數癌細胞分化情形良好，僅有少數細胞異化 (anaplasia) 之情形；第二級分化 (grade 2) 指癌細胞中度分化併發細胞核多樣化 (pleomorphism) 及核仁突出情形；第三級分化 (grade 3) 指細胞分化極差且有極高的細胞核細胞漿比例 (N/C ratio)。圖 2-2 與表 2-3 可以簡單的分類不同時期的膀胱癌。

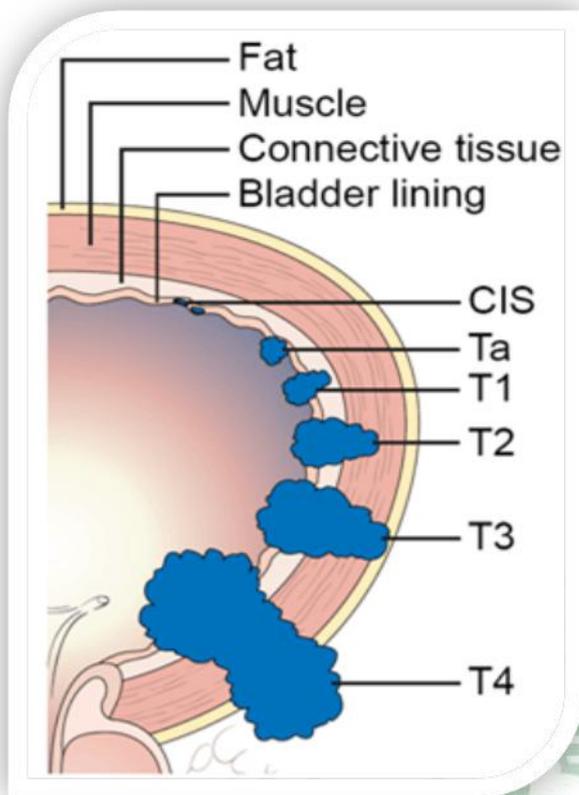


圖 2-2 不同時期膀胱癌之分類⁽¹²⁾。

表 2-1-1 膀胱癌之期別系統(WHO)⁽¹³⁾。

Jewett-Marshall 階段分類	Findings/ UICC 分類	表現
O	原位癌/ Tis	癌病細胞局限在內表層
A	乳突腫瘤僅侵犯黏膜層/ Ta	癌病細胞局限在內表層
B1	腫瘤侵犯到黏膜下層/ T1 腫瘤侵犯到淺層肌肉層/ T2	癌細胞侵犯至肌肉層
B2	腫瘤侵犯到深層肌肉層/	癌細胞侵犯至肌肉層

	T3a	
C	腫瘤侵犯到膀胱外圍脂肪層/T3b	癌細胞侵犯至外脂肪層
D1	腫瘤侵犯到緊鄰器官/T4	癌細胞侵犯至外脂肪層,或 癌細胞已發生轉移
D1	局部淋巴結轉移/ N1-3	癌細胞已發生轉移
D2	遠處淋巴結轉移/ N4	癌細胞已發生轉移
D2	遠處器官轉移/M1	癌細胞已發生轉移



五、膀胱癌的营养照护与预防⁽¹⁴⁾

平時應少染髮、少接觸染料及有機溶劑，不吸菸。不要養成憋尿習慣，最好每小時排尿一次。多喝水，至少 3 公升/天，可減少致癌物質在膀胱中的濃度。儘量不吃含防腐劑與化學物質的食物，蔬果多吃但是農藥要徹底洗淨。多攝取高量的抗氧化物質：維他命 C、A、E；多喝綠茶攝取多酚類；另外像是十字花科的蔬果都含有許多植物天然抗癌因子，一天攝取蔬果九份。維他命 B 群參與許多生化代謝，多攝取可幫助細胞修復。有些營養研究指出某些 B 群維生素可抗癌。牛奶或黃豆類都被指出含有大量鈣離子與維生素 D，鈣離子已有不少研究指出具有抗癌的能力⁽¹⁵⁾，建議早晚各一杯 400 ml 的低脂牛奶。

六、 癌症與中西醫結合療法⁽¹⁴⁾

第1節 中西醫結合化學療法

應用化療藥物治療惡性腫瘤已經有六十多年的經驗了，隨著不同治療方法也各自提高了不同的腫瘤患者的存活率和生活質量。但由於抗藥性及化療的副作用，影響化療的療效。近年來，中西醫結合在化療的減低毒性與增強療效方面有不錯的成果，也越來越多醫院開始採用中西醫結合療法。

中國中醫研究院廣安門醫院孫桂芝主任醫師，選用補益脾腎、解毒抗癌中藥，研製出扶正防癌飲，包含了黃芪、枸杞子、太子參、何首烏、藤梨根；草何車等。臨床發現，採用扶正防癌飲合併化療治療晚期胃腸癌術後病人，證實該藥具有增加化療藥物抗癌能力和提高免疫功能的作用，並且明顯提高患者的生存質量。其中 64 名胃癌患者在 1、3、5 年的存活率分別為 98.43%、82.69%、60%，47 名腸癌患者則分別為 95.74%、81.69%、72.73%，證實該藥物具有防止復發與轉移的效果。實驗研究證明，該藥物具有較好的抗氧化作用，提高體內某些養化酶及氧化還原酶的活性，調節血清內微量元素的不平衡狀態。

一、中醫藥對化療的幫助⁽¹⁶⁾

抗腫瘤藥物殺害癌細胞的同時，對於人體的某些正常組織器官細胞也會有一定的損害。主要出現在腸胃道、骨髓造血組織和生殖細胞。還有一些藥物對某些特定的組織器官有損害(肝、脾、腎...等)。到了 80 年代後期，5-FU 拮抗劑、聚落刺激因子的出現，為癌症的化療推進了一大步。在這之前化療的副作用是影響化療療效的主要因素，許多病患都是因為副作用而放棄化療，中醫藥在化療減低副作用的方面是有許多明顯的療效。

主要是在辨證論治的基礎上，依照病人的正氣、邪氣盛衰情況制定相應之法則。例如：

	辨証論治	治法	代表方劑
	益氣法	益氣健脾	四君子湯
	養血法	養血和血	四物湯
扶正培本法	養陰法	養陰生津	生脈散
	溫陽法	益氣溫陽	腎氣丸
	疏肝理氣法	疏肝理氣	半夏厚朴湯
	活血化淤法	活血化瘀	血府逐瘀湯
驅邪疏理法	清熱解毒法	清熱解毒	五味消毒飲
	化痰散結法	化痰散結	尋痰湯

二、化療副作用的中醫治療^(17, 18)

化療藥物的副作用主要包括骨髓抑制、消化道反應、心臟毒性、肝功能反應、腎毒性等，以中醫辨証論治可以提高化療療效，也可以減輕不同程度的化療副作用。

1. 骨髓抑制-

骨髓抑制是化療的主要副作用之一，現代醫學針對其副作用，目前主要採用骨髓移植及聚落刺激因子等來防治。由於價格貴，其使用的範圍受到一定的限制，骨髓抑制主要指白血球下降，血小板減少及貧血等症狀，臨床上主要表現為面色萎黃或蒼白，唇甲色淡，疲乏無力，頭暈眼花，心悸失眠，手足麻木等症狀，在中醫學屬於血虛症的範圍。

中醫學認為血是構成人體和維持人體生命活動的基本物質之一，主要由營氣和津液所組成，具有營養和滋潤全身的生理功能。血的生成是人體所攝入的食物經脾胃消化吸收的各類營養素所組成。

氣在血的生成過程中佔很重要的地位，表現為營氣是血液的重要組成部分，將身體攝入的食物消化轉成中醫說的水谷精氣，進而化成營氣和津液。血和津液的生成都來自於水谷精氣所化生，故有“精血同源”的說法。津液注入於脈中，即變成血液組成部分。精和血之間亦存在著相互滋生和相互轉化的關係，精藏於腎，血藏於肝，肝腎之間關係極為密切，有肝腎同源之說。血的化生有賴於腎中精氣的氣化，腎中精氣的充盈，亦有賴於血液的滋養，所以說精能生血，血能生精，稱之為“精血同源”。人生病的狀態下，血虛多因脾胃虧虛，水谷精微不足以生血，氣虛而生血不足，精氣不足以滋血，津液不足以濡血所致。此外，血瘀亦為血虛的重要原因，淤血形成以後，不僅失去正常血液的滋養功能，反而阻礙血液生成而導致血虛。

化療藥物進入身體後，在殺害癌細胞的同時，也會損害正常組織，傷及脾胃，導致脾胃運轉功能失調，生化不足而導致血虛，化療藥物導致腸胃功能失調，引起嘔吐；大腸功能失調導致腹瀉，吐瀉傷津，津不生血而致血虛。治療上，以血虛症候為主，治療以補血為要。同時針對脾胃虧虛，與以健脾和胃為法，給予補精、補氣、生津為治，針對血瘀內停，新血不生，予以活血化瘀。臨床上針對骨髓抑制可採用以下法則：健脾養胃補血，益氣養血，補腎填精生血，生津補血，活血化淤養血等。

辯証論治	治法	主要方劑
脾虛血虧	健脾養胃，補血	四君子湯加減
氣血雙虧	益氣養血	八珍湯加減
精虧血少	補腎填精生血	河車大造丸

津枯血虧

生津潤燥

生脈散加減

淤阻血虧

活血生血

桃紅四物湯加減

2. 消化道反應-

化療大部分化療藥物都能引起不同程度的噁心、嘔吐、其中嘔吐程度最重的藥物為 MTX、5-FU、VP-16、CBP、長春鹼、長春新鹼等。化療藥物可以直接刺激腸胃道引起嘔吐之外，化療藥物通過血液作用於延腦嘔吐中樞引起嘔吐，也可以刺激第四腦室的化學感受器觸發受體的傳導物質，治療多以疏肝理氣、溫化痰飲、健脾和胃、養陰潤燥。

辯証論治	治法	主要方劑
肝氣犯胃	舒肝理氣，和胃降逆	半夏後朴湯
痰飲內阻	溫化痰飲，降逆止嘔	二陳湯合苓桂術甘湯
脾胃虛弱	健脾和胃降逆	六君子湯
胃陰不足	養陰潤燥，降逆止嘔	麥門冬湯

3. 心臟毒性-

有心臟毒性的藥物有：阿霉素、表阿霉素。中醫學屬於心悸的範疇，多屬於心虛膽怯、心血虧虛、肝腎陰虛、痰飲內停、血脈淤阻所致，治療以益氣養心、滋養肝腎、理氣化痰為主。

辯証論治	治法	主要方劑
心虛膽怯	益氣養心，鎮靜安神	益氣養心湯
心血虧虛	益氣養血，滋陰復脈	灸甘草湯
心氣不足	補益心氣	伍味子湯

肝腎陰虛	滋養肝腎，養心安神	一貫煎
痰飲內停	理氣化痰，寧心安神	尋痰湯
血脈淤阻	活血化淤通脈	血府逐淤湯

4. 肝功能損害-

對肝功能損害化療藥物有氟尿嘧啶、放線菌素 D。中醫學屬於臟痛、黃疸等範疇，治療多以舒肝理氣、祛淤通絡、清熱利濕、養陰柔肝為法。

辯証論治	治法	主要方劑
肝氣鬱結	舒肝理氣	柴胡疏肝散
淤血停著	祛淤通絡	復元活血湯
肝膽濕熱	清熱利濕	龍膽瀉肝湯
肝陰不足	養陰柔肝	一貫煎

5. 腎毒性-

卡鉑、順鉑等藥物常有腎損傷，尤其在用藥劑量較大而又未予水化利尿時可引起嚴重腎損害，中醫辯證多屬於膀胱溼熱、肝郁氣滯、中氣不足、腎陰陽兩虛。

辯証論治	治法	主要方劑
膀胱溼熱	清熱利濕	八正散
肝郁氣滯	疏利氣機，通利小便	沉香散加減
中氣下陷	益氣健脾	補中益氣湯
腎陽不足	益氣溫陽	腎氣丸
腎陰虧虛	滋陰補腎	六味地黃丸

6. 神經毒性-

長春鹼類藥物常發生周圍神經炎，表現為指端麻木，肌腱反射減弱或消失、感覺異常、少數可發生感覺消失，垂足，肌肉萎縮或麻木、直立性低血壓、膀胱張力減弱，便秘或麻痹性腸阻塞。一般停藥後，症狀即消失且自行恢復。中醫治療以益氣養血、活血化淤為法。

辯證論治	治法	主要方劑
氣虛失運	益氣健脾	補中益氣湯加減
血虛不榮	養血和營	四物湯加減
痰淤阻滯	化痰活血	桃紅四物湯合二陳湯

7. 脫髮-

有些抗癌藥物，尤其是蔥環類藥物常發生脫髮，嚴重者甚至全禿。化療藥作用於毛囊，引起暫時性脫髮。表現為頭髮減少，稀疏，部分脫髮或全禿，體毛脫落。停藥後一~二個月即可恢復再生。中醫治療以益氣健脾、養血生髮、滋養肝腎為主。

辯證論治	治法	主要方劑
中氣不足	益氣健脾	補中益氣湯
血虛不榮	養血生髮	四物湯
肝腎陰虛	滋養肝腎	六味地黃丸

8. 肺毒性-

平陽酶素、苯丁酸氮芥等有時亦可發生肺毒性。主要症狀為胸悶、氣短，病感染咳嗽、咳痰。治療宜健脾益氣，祛痰降逆、養陰潤肺、溫補脾腎。

辯証論治	治法	主要方劑
肺脾氣虛	健脾益氣	補中益氣湯
痰濕壅肺	祛痰降逆，宣肺平喘	三子養親湯合二陳湯
肺陰虛	養陰潤肺	百合固金湯
肺腎兩虛	補益肺腎，止咳平喘	人蔘蛤蠣散
脾腎陽虛	溫補脾腎	金匱腎氣丸

9. 局部反應-

有些刺激性較強的抗癌藥物，如常春鹼類、蔥環類藥物等，使用不當易引起栓塞性靜脈炎。其主要表現為化療藥物使用靜脈部位疼痛，皮膚發紅，以後沿靜脈皮膚色素沉著，脈管成索條狀變硬或導致靜脈栓塞。當化療藥物漏入皮下即可引起局部皮下組織的化學性炎症，表現為漏藥部位紅腫，疼痛嚴重，如漏藥當時未做處理可引起局部皮下壞死、潰爛。

辯証論治	治法	主要方劑
熱毒蘊結	清熱解毒	二黃煎外敷
脈絡阻滯	活血化瘀	七厘散
瘀血阻絡	生肌長肉，去腐生新	生肌玉紅膏外敷

第2節 中西醫結合放射療法⁽¹⁹⁾

放射治療是治療腫瘤的重要方法之一，放射治療前應明確診斷，確定腫瘤部位，以達到對腫瘤部位的充分照射，又最能保護到最多正常組織器官。放療主要用於頸部腫瘤、食道癌、肺癌、乳癌等腫瘤的治療，在很多情況下，單純放療是不能達到滿意的效果。

X射線與 γ 射線：都屬於電磁輻射又稱光子，X射線在X射線直線加速器，而 γ 射線來自人造核元素。X射線是目前放射治療中應用最廣泛的一種射線，能量低於1 MeV的X射線因為骨頭吸收多、皮膚表面劑量高，臨床上已經很少人使用。目前廣泛性應用的是4~25 MeV的X射線。其特點是：1.深部劑量高。2.皮膚表面劑量低。3.通用性高。4.軟組織與骨頭的吸收相近。5.製成各種型態的放射線同位素線放射源。6.高能量放射線穿透能力強。

中子放射治療：產生中子的設備和方法有中子產生器和迴旋加速器兩種。前者體積小，前者體積小造價相對較低；後者造價昂貴，體積龐大，但輸出能量高、性能可靠。其特點是：1.中子是高射線，在射程中損失能量較大，其深部劑量與鈷-60相似。2.中子束半影大。3.皮膚的減免作用差，皮膚與皮下組織反應大。4.中子在組織內發生彈性和非彈性散射，脂肪等皮下組織較X射線和鈷-60纖維化嚴重。

γ 放射刀：是一門嶄新的學科-立體定位放射外科。 γ 放射刀結合現代電腦、立體定位技術和放射外科技術於一起，在接受CT或核磁共振檢查後，將 γ 射線具及通過精確立體定向，一次性、直接的摧毀靶點內的組織，達到外科手術或毀壞的效果。由於採用旋轉聚集的方法，射線在經過人體正常組織時，人體組織會受到瞬間，幾乎無傷害的照射，而且劑量銳減，因此治療照射範圍與正常組織界線非常明顯，邊緣如刀割一樣故稱之為“ γ 放射刀”。它不像外科手術那樣馬上切除病變組織，但需要治療的部位在接受照射有一個蛻變、壞死、吸收的過程。1997年全身性的 γ 放射刀問世，目前已經有一百多個國家已經廣泛應用在臨床治療

了。

早在 70 年代就已經開始應用中醫藥配合放療的增效減毒研究，經過 30 多年的臨床及實驗研究，已取得良好的療效，且得到醫學界的認同。

中國醫學科學院腫瘤醫院放療科用活血化淤中藥處理放療組與單純放療組對照分析 197 例鼻咽癌患者。其中中藥加放療組的 1~5 年腫瘤再發者 28.8%，單純放療組復發率 33.3%。統計學證明有顯著差異，證明活血化淤中藥對放療治療是有幫助之效果。潘明繼用扶正生津湯治療鼻咽癌；廣安門醫院腫瘤科採用扶正培本、活血化淤為主要法則治療食道癌；中山醫科大學腫瘤醫院中醫科用放療合併活血化淤中藥治療治療鼻咽癌患者放療後出現青紫舌……等等許多實證臨床經驗都已證實中藥對放療是有增效的作用。^(18, 20)

辯証論治	治法	主要方劑
養陰法	養陰生津	生脈散
活血化淤法	活血化瘀	血府逐淤湯
清熱解毒法	清熱利濕	五味消毒飲

以下為針對不同的放療部份，採用相應的治療法則：

腦部放療-

腦部放療	治法	主要方劑
肝陽上亢	平肝滯陽	天麻鉤藤飲
痰濁內蘊	燥濕化痰	半夏白朮天麻湯

瘀血阻絡	活血化瘀	血府逐瘀湯
腎精不足	補腎填精	河車大造丸

胸部放療-

胸部放療	治法	主要方劑
痰濕內蘊	燥濕化痰	二陳湯
肺脾氣虛	健脾補肺	補肺湯
瘀血阻絡	活血化瘀	血府逐瘀湯
胸陽不振	補益陽氣	瓜蒌薤白桂枝湯

腹部放療-

腹部放療	治法	主要方劑
淤阻腸絡	化淤通絡	少腹逐瘀湯
濕熱內蘊	清熱利濕	葛根芩連湯
脾胃虛弱	健脾益氣	參苓白朮散
腎氣不足	補腎固澀	四神丸

第3節 中西醫結合手術療法⁽¹⁹⁾

手術治療是腫瘤治療中最原始的方法之一。大部分的腫瘤以手術為選治療方法，但只有在腫瘤上侷限於原發部分及區域淋巴節時才有效。惡性腫瘤的手術特點不同於一般手術，惡性腫瘤有局部擴散與轉移之可能性，手術操作不當，很可能造成腫瘤的散播。

現代醫學惡性腫瘤外科治療經歷了三個階段，腫瘤局部廣泛切除加區域性淋巴節清除術，即 Halstead 原則，開創了腫瘤根治術，在二十世紀上半葉，在腫瘤外科站非常重要的地位。該原則強調廣泛切除，乎是器官功能的保存，強調手

術刀的作用忽視其他治療的作用。40 年代麻醉術的發展，抗生素的應用和輸血的完善使外科手術的安全性，手術越做越大。進入 50、60 年代發展了一些超根治手術，手術範圍及創傷很大。如全胃切除等實踐證明並未提高療效。至此腫瘤外科由器官破壞轉到功能保護型。

中國外科的歷史悠久，東漢時期名醫華佗採用麻沸散麻醉後切除腫瘤就有記載，顯示中醫學在外科手術上早有極高的水準。腫瘤的外科治療創傷大，致殘率高。因此臨床診斷和分期以及病理診斷是腫瘤外科治療實施的重要前提，同時結合病人的身體狀況。

一、術前治療

辯證論治	治法	主要方劑
肝氣鬱結	舒肝理氣	柴胡疏肝散
脾胃虛弱	健脾和胃	六君子湯
腎氣虛	補腎填精	河車大造丸

二、術後治療

辯證論治	治法	主要方劑
氣血雙虧	益氣養血	八珍湯加減
痰淤互結	化痰利濕，活血化瘀	二陳湯合血府逐瘀湯
氣陰兩虛	益氣養陰	生脈散加減

第4節 中西醫結合免疫療法⁽¹⁹⁾

免疫是生物體的一種特異性生理反應，在免疫反應過程中，生物體內通過認識自我與非自我，排除抗原性異己，維持體內環境的穩定。免疫功能大體上包括免疫防禦、免疫穩定和免疫監視。免疫防禦作用主要是阻止、抵禦病原微生物的感染和入侵。如果反應過高，則引起超敏反應。如果免疫反應過低，則出現免疫缺陷疾病。生物體若能通過免疫功能的作用，清除損傷或衰老的細胞，以維持自身的穩定狀態，假如功能失調，就會發生自身免疫性疾病。

免疫系統由免疫器官、免疫細胞和免疫分子組成，免疫器官由中樞性免疫器官，骨髓和胸腺，以外周性免疫器官，淋巴節、脾臟和具有免疫作用的細胞構成。免疫細胞包括輔助性 T 細胞 (TH)、細胞毒性 T 細胞 (CTL)、NK 細胞、巨噬細胞、B 細胞。B 細胞產生的免疫球蛋白即抗體，T 細胞則是執行細胞吞噬功能的主體細胞。T 細胞為胸腺發育分化成的依賴胸腺淋巴細胞，通過識別與殺滅作用，行使細胞免疫功能。免疫分子包括細胞因子、免疫球蛋白分子和補體系統分子。與免疫有關的細胞因子有介白素 (IL)、干擾素 (IFN)、腫瘤壞死因子 (TNF)、免疫球蛋白 (Ig)。其中免疫球蛋白屬於一組具有抗體活性的醣蛋白分子，包括 IgG、A、M 及少量的 Ig 分子。免疫功能與腫瘤發生和發展關係密切。當宿主免疫功能低下或受抑制時，腫瘤發病機率增高，反之亦然。一些研究指出癌細胞表面的受體明顯減少，從而阻止免疫細胞消滅癌細胞，這對治療自體免疫疾病、癌症與器官移植排斥等疾病的研究和治療有深遠的意義。⁽²¹⁾

一、生物反應調節劑之分類

在體內的免疫反應過程中，調節體內免疫反應能力的一切生物活性物質，稱為生物反應調節劑。根據其定義，可分為以下種類。

1. 天然或基因重組細胞因子：介白素 (Interleukin)、干擾素 (IFN)、腫瘤壞死因子 (TNF)、聚落刺激因子 (CGF) 等。

2. 抗腫瘤的各類體細胞和輔助性的造血幹細胞。如 LAK 細胞、TIK 細胞、TAK 細胞、骨髓幹細胞或臍帶血幹細胞。
3. 抗體：包括各種抗腫瘤單株抗體、抗細胞表面標記抗體（CD marker）。
4. 基因治療。
5. 腫瘤疫苗。
6. 抗血管生成劑。
7. 細胞分化誘導劑。
8. 酶制劑或酶抑制劑。
9. 某些菌類及其有效成分：如卡介苗（BCG）、短小棒狀桿菌（CP）、鏈球菌（OK432）、濟南假單胞菌等。
10. 植物藥包括中藥的有效成分：如香菇多糖、靈知多醣、黃芪多醣、刺五加多醣、枸杞多醣、淫羊藿多醣、人蔘皂苷多醣、冬蟲夏草等。
11. 有機酸及小分子合成劑。

二、常用的生物反應調節劑

目前在臨床上常用的生物反應調節劑有 10 餘種，主要應用在惡性黑色素瘤、惡性淋巴瘤、腎癌等腫瘤有一定的確切療效。如下：

生物反應調節劑	藥理及應用
卡介苗	原用於預防結核病，屬於特異性免疫制劑，後來研究證明它具有巨噬細胞的吞噬功能的作用，為非特異性免疫增強劑。現用於惡性黑色素腫瘤，或在肺癌、急性白血病、淋巴瘤手術和化療作為輔助治療。
短小棒狀桿菌菌苗	為短小棒狀桿菌菌苗的死菌懸浮態，是一種強的非特異性免疫增強劑。他的作用機制尚不太清楚，可能主要通過激活巨噬細胞，使其吞噬活性加強，亦有刺激細胞 B

	<p>細胞增生，促進高效價 IgM、IgG 抗體的合成。臨床用於惡性黑色素腫瘤、乳腺癌、小細胞肺癌。</p>
干擾素	<p>IFN 是一種醣蛋白，其主要作用有：直接抗病毒作用、增強主要組織相容性抗原 (MHC) 和腫瘤相關抗原 (TAA) 的表達、增強 NK 細胞作用、增強抗體依賴性細胞 (ADCC) 的作用，直接抗細胞增生的作用與抗血管新生作用。IFN 有三種，即 IFN-α、IFN-β、IFN-γ，其中 IFN-α、IFN-β 具有相同的受體即 I 型受體，IFN-γ 連結在 II 型受體上。</p>
介白素 II	<p>介白素 II 主要活性有促進 T 細胞生長和增殖，增強和誘導免疫細胞的毒殺活性，增強 T 細胞產生和聚落刺激因子。</p>
免疫核糖核酸	<p>存在于淋巴細胞中，其分子量約為 13500，可以用人類腫瘤組織、免疫的羊或其他動物的脾臟、淋巴節提取。也可從正常人周圍白血球和脾臟白血球中提取。他是未致敏的淋巴細胞轉化為免疫活性細胞。由於免疫核糖核酸具有一定的特異性，且不受動物種類的影響，又不存在書寫免疫活性細胞的排斥問題，所以受到廣泛的重視，但免疫核糖核酸可被 RNA 酶裂解，還需進一步研究。目前用於腎癌、肺癌、消化道癌等。</p>
胸腺素	<p>可使由骨髓產生的幹細胞轉變為 T 細胞，因而有增強細胞免疫功能的作用。對體液免疫的影響甚微。其作用可能是可連續誘導 T 細胞分化發育的各個階段；具有調節體內的免疫平衡作用；能增強成熟 T 細胞對抗原或其他刺激的反應。</p>

第5節 中醫與免疫的關係

中醫學再兩千年前就已經認識體內正氣與疾病發生、發展及預後的重要性。中醫說的正氣即包含現代醫學所謂的免疫功能。近四十年來中西醫結合治療腫瘤的臨床研究表明，扶正培本、活血化滯、清熱解毒等法則的抗瘤作用與其調節免疫功能有密切的關係。

（一）扶正培本法與免疫

1. 免疫與正氣虛的關係：肺氣虛與免疫-肺主氣，司呼吸，肺氣虛則衛外功能降低，因而易於感冒或自汗；脾氣虛-脾主肌肉，為氣血生化之源，在五臟中有脾為後天之本之說，涵蓋現在醫學的消化、內分泌、神經、血液等系統；腎氣虛與免疫-腎主精藏，主骨，主生殖，為五臟元陰元陽之所在。現代醫學認為腎與神經內分泌、免疫功能尤為密切。
2. 扶正培本法在免疫中的作用

扶正培本法提高體內細胞與體液免疫功能，促進網狀內皮系統吞噬功能，改善體內免疫狀態，調整腫瘤患者體內 cAMP/CGMP 的比值，提高 cAMP 相對值而抑制腫瘤細胞的生長。

（二）活血化滯法與免疫

活血化滯能調節體內的免疫功能和促進新陳代謝，對體內的免疫功能有雙向調節作用。有一些活血藥物可以抑制抗體的產生，減弱特異性免疫，具有類似免疫抑制劑的作用。還有一些活血藥物可加強細胞免疫，促進淋巴原細胞轉化，增加網狀內皮系統功能及吞噬細胞活力，類似免疫增強劑的作用。

（三）清熱解毒法與腫瘤

清熱解毒中藥的免疫調節作用，除與抗發炎抗病原體作用協調發揮作用外，還有增強免疫和抗變態反應的作用。

一、免疫中藥的研究

(一) 促進網狀內皮系統的中藥

1. 促進網狀內皮系統吞噬功能-人參、黃芪、黨參、白朮、甘草、靈芝、山藥、黃精、龜甲、牡蠣等。
2. 興奮網狀內皮系統而大量釋放的巨噬細胞-丹參、赤芍、桃仁等。
3. 促進巨噬細胞的吞噬作用-金銀花、穿心蓮、魚腥草、山豆根、野菊花、黃連等。

(二) 激活體液免疫的相關中藥

1. 促進干擾素產生-黃芪、刺五加、山藥、北沙參、紫河車、石斛、降香、龍膽草等。
2. 促進抗體增生-黃芪、刺五加、黨參、枸杞子、何首烏、附子、苡仁、當歸等。
3. 促進淋巴細胞轉化的中藥-人參、黃芪、靈芝、香菇、苡仁、絞股藍、淫羊藿等。
4. 促進細胞增殖的中藥-人參、黃芪、靈芝、雲芝、絞股藍等。
5. 促進單核巨噬細胞數量增加的中藥-黃芪、雲芝、黨參、香菇、枸杞子、甘草等。
6. 促進單核巨噬細胞的吞噬功能增強的中藥-人參、黃芪、靈芝、香菇、豬苓、大蒜、金銀花、大黃、白英、石榴皮、大薊、枸杞子、丹參、魚腥草、刺五加、黃連、野菊花、蒲公英、蟾酥等。

二、免疫中成藥的研究⁽²²⁾

(一) 中草藥單體的研究

1. 香菇多醣-從香菇子實體提取的多醣體，分子量約五十萬。具有生物免疫調節功能，增強NK細胞、T細胞功能。也具有抑制腫瘤的作用，實驗證明小鼠靜脈注射1 mg/kg 香菇多醣，對腫瘤的

抑制率達到 90%。臨床上有人以香菇多醣促進未成熟的殺手 T 細胞，拮抗腫瘤化療引起的細胞免疫的抑制。成人口服每次 12.5 mg；兒童每次 7.5 mg，一天兩次。若有不良反應類似胸悶、休克、噁心、嘔吐等，停藥後症狀即消失。

2. 豬苓多醣-主要可提高體內的細胞免疫功能。小鼠實驗證明豬苓能增強腫瘤小鼠的免疫功能，使巨噬細胞的吞噬力提高。北京中醫學院以豬苓多醣治療肺癌，給藥兩周後病人的細胞免疫功能明顯高於給藥之前。
3. 茯苓多醣-能活化 T 細胞，使免疫監視系統功能復原，有顯著的抗癌作用。
4. 黃芪多醣-研究指出具有抗氧化的功能，並能增強巨噬細胞的吞噬作用。

(二) 經方的研究

1. 補中益氣湯-小鼠靜脈注射補中益氣湯制劑後取其腹腔巨噬細胞進行螢光標定抗體觀察，發現細胞尚有 C₃ 段裂產物 C₃b 的結合，顯示其吞噬微粒的能力較控制組提高近四倍之高。
2. 四君子湯-動物實驗指初四均子湯對抗體行程細胞有刺激作用。主要藥物：人參、白朮、茯苓、甘草。
3. 四物湯-藥理研究指出具有促進網狀內皮系統吞噬內毒素的作用。對細胞免疫有明顯的激活作用。
4. 六味地黃丸-藥理研究指出能促進細胞免疫，提高患者的生存時間。中國中醫研究院研究所姜廷良的研究指出此方劑可治療食道上皮重度增生病患。
5. 玉屏風散-藥理研究指出此方劑具有炎患肺、肝、脾的老化性病變，降低腫瘤的發病率，具有免疫增強功能、延緩老化的作用。
6. 血府逐瘀湯-研究指出此方劑能使癌細胞轉移能力被免疫細胞抑

制，降低血小板凝集。

(三) 現代中藥複方的研究

1. 腫瘤平膏-臨床研究指出以此複方治療晚期肺癌患者可以提高患者的免疫功能，血氧分壓等指標顯示可以抑制癌細胞生長。
2. 扶正防癌飲-孫桂芝主任醫師以補益脾腎、解毒抗癌中藥研發出扶正防癌飲。臨床觀察以此方劑治療晚期胃癌病患可以明顯提高病人的生存質量與存活率。

七、 人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells) 細胞型態

- a. 起源：高雄三軍總醫院一位 65 歲男性患者。
- b. 購自：食品工業發展研究所
- c. 分類： grade 2, stage A, papillary TCC (Transitional cell carcinoma)
- d. 生長狀態：貼附型細胞
- e. 培養環境：RPMI-1640、37°C、5%CO₂
- f. 細胞型態 (morphology) -200X

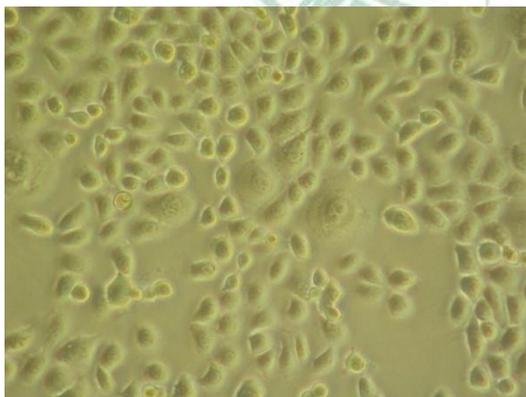


圖 2-3 TSGH-8301 細胞型態 (食品工業研究所)。

第二節、蜂肽 (bee venom) 之介紹

蜂肽在悠久的中華文化中，從一千多年前就被使用來當作消炎藥使用的記錄。甚至在兩千多年前的古埃及石刻上也發現聰明的埃及人早就把蜂肽當做藥物來使用。另外一千七百多年前古羅馬醫學家蓋倫 (Galen) 記述蜂毒可作止痛等多種用途。雖然古代書籍都有記載各種蜂肽的使用與用途，但是卻極少知曉其作用機制，直到近代拜高科技所賜，許多人慢慢解開這用途極廣的天然藥物的神秘面紗。不同領域的研究學者各自在其領域研究蜜蜂到底擁有多少能耐以及其確切的作用機制。在本實驗中主要研究方向是蜂肽 (bee venom)，又稱蜂毒，是一種由蜜蜂尾部毒針分泌的透明物質所粗抽出來的一種複合物⁽²³⁾。

A. 蜂肽來源：義大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)

B. 蜂肽組成：

蜂肽含水分 80%—88%，其組成中蛋白質類占 75%，灰分占 3.7%，含有鉀、鈉、鎂、銅等離子。蜂肽是一種成分複雜的混合物，已知含有多肽類、酶類、生物胺和其他物質。蜂肽以多肽為主，它們具有特殊的生物活性。如表 2-2：

表 2-2-1 蜂肽中各種成分之應用。(24)

化合物	已研發功效應用
蜂毒肽(Melittin)	Melittin (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂) 是蜂肽中含 26 個胺基酸殘基的多肽，具有抗菌和溶血等生物活性，是典型的陽離子抗菌肽。
蜂毒明肽(Apamin)	是一種神經毒素。由 18 個胺基酸構成，分子量為 2038。
MCD-肽(mast cell degranulating peptide)	MCD-肽能使動物肥大細胞，釋放組織胺，具有消炎作用。由 22 個胺基酸組成，分子量為 2593。
心肽(Cadiopep)	具有保護心血管作用且毒性較低的一種多肽，由 11 個胺基酸組成，分子量為 1940。心肽是有抗心律失常作用類 p-腎上腺素活性。
賽卡平(Secapin)	生理作用類似於蜂毒肽，故又稱為 Peptide-M。
安度拉平(adolapin)	具有很強的鎮痛和抗發炎作用，由 105 個胺基酸組成，分子量為 11092。
透明質酸酶(h~alronidase)	透明酸酶幾乎是動物毒素中普遍存在的一種成分，沒有直接毒性，但具有很強的生物活性，參與蜂毒對組織局部作用，促使蜂毒成分在局部組織滲透和擴散。
磷酸脂解酶 A2(phospholipase A2)	磷酸脂解酶 A2 能迅速水解磷酸脂解磷脂，並且有其他藥理作用，它具有很強的溶血活性。
組織胺(histamine)	主要引起平滑肌及橫紋肌的緊張收縮，使皮膚

灼痛。

多巴胺(dopamin)

它是蜂毒中的抗炎物质，也是人體神經傳導物質之一。

蜂肽概論《蜂針療法·李萬遙》

一、蜂肽針概論⁽²⁵⁾

蜂針是取自蜜蜂的工蜂產卵器特化而成，蜂針在脫離蜜蜂身體之後，會有節奏的不斷的收縮，使蜂針深入且自動的將蜂肽注入動物體內，釋出蜂肽（bee venom）。蜜蜂已經在地球上生存了八千萬年了，古代的人類為了拿取美味的蜂蜜，常常會進入蜂窩中取蜜，而被蜂螫。蜂螫之後可能會引起局部或全身反應，但某些人又發現被蜂螫之後同時又會治好關節炎，風濕等疾病。於是在人類有了醫學方面知識的時候，便開始有利用蜂針來治療某些疾病的記載。包括歐洲的亞里斯多德、埃及的古文明石刻記載、三千多年前的中國《黃帝內經》就有以蜜蜂治療疾病的記載。其中又以傳統東方醫學加以發揚光大，詳細記述蜜蜂為人類健康努力的點點滴滴。⁽²⁶⁾

在物資缺乏的時代，蜂針算是取材容易，成本較低的一種醫療材料。故老祖先們才能在民間早就學會利用各種大自然的材料來治病，這也就是蜂療源自於民間的原因。一般來說蜂針療法有三種作用：針、藥、灸。針：指的是蜂的尾刺如針，能刺激人體的經絡，藥：指蜂針中的蜂肽輸入人體能發揮蜂肽的各種藥理功效，抗菌消炎、治療疾病。灸：是蜂針刺了之後，會有局部紅腫的效果，有類似溫灸效果，可活絡經脈。

蜂針治療的方法既簡單又複雜。簡單來說任何人都可以輕易的取到蜜蜂可讓其刺激；複雜的說，如何掌握病情，因人因地因病因時而改變，甚至連蜜蜂都要加以選擇，如何取穴治療，如何不使患者產生過度的過敏反應，都是極大的學問，經驗老到的醫師才能依照行醫多年的經驗治療病人。取穴的原則基本上是遵

循中醫辯證論治，取穴為阿是穴結合辯証取穴，以此來提高療效。

蜂蜜之甜，人盡皆知；蜂螫之痛，令人生畏。人人都怕蜂叮，實際上蜂針治療是有表皮痛及過敏的弊端。但蜂刺痛有明顯個體差異，李萬遙先生以蜂針療法所醫治的數千病患中，認為蜂螫並不太痛的人高達 50%。許多人在克服了初期反應後，都很樂意的接受蜂針療法。臨床上只要嚴格控制蜜蜂量，掌握正確的治療方法及病患體質，過敏反應是可以降低到最小。因此蜂針是既有效又安全的，但是前提是，要瞭解病情，了解蜂針治療規律，最好到醫院進行蜂療，以免出現休克等嚴重過敏反應。

目前國內外醫學界對蜂肽針的研究非常青睞。《中藥大辭典》中即列舉了蜂毒的許多藥理作用。蜂毒味苦、辛，而性平，氣味芬芳，為無色或淺黃色透明液體。蜂肽化學成分非常複雜，包含多種多肽與酶類，我們會在表 2-2 中討論其成分與功能。目前已之功用包含：使血管擴張，調整免疫機制；延長血液凝固時間與抗血栓，活血化瘀；可消炎止痛而治療多種關節痛；可刺激有機體產生激素而治療過敏性疾病等。目前人類越來越重視天然療法的應用，讓我們期許小小的蜂針能造福更多病患。

二、蜂療簡史

蜂療醫學是利用與研究如何使用蜂針、蜂毒和蜜蜂產品來治療疾病的一門學科。它是我國傳統醫學的一條分支，與中醫學、中藥學緊密結合，形成獨特的風格，顯示卓越的效果，早就在傳統醫學中受到人們的重視。

蜂針是由蜜蜂中的工蜂產卵器特化而成。蜂針螫入人體之後即會排出蜂肽，使不同人體產生不同反應。目前市面是有許多蜜蜂產品，像是：蜂蜜、蜂王漿、蜂膠、蜂毒、蜂蛹...等等周邊產品皆被人們用來保健與防治疾病。

中國養蜂歷史悠久，已有三千多年。公元前 770 前的東周時期，即有記載蜂針治病；醫學專著《黃帝內經》中也有蜂療法的記載；藥學專著《神農本草經》

中收錄了蜂蜜、蜂子和蜂臘視為上品藥材，並提出蜂蜜味甘、無毒，主心腹邪氣，安五臟不足，益氣補中，止痛解毒，除百病。久服志強身輕，不飢不老，延年等論述；1972 年出土的武威東漢墓葬品竹簡醫書《治百病方》有介紹治療咳嗽的蜜丸和湯劑。

1973 年湖南長沙馬王堆出土的 3 號漢墓中，有公元前 2 世紀的古方書《五十二病方》，其中就有兩處用蜂子，一處用蜂蜜治病的配方。漢代醫聖張仲景在《傷寒論》記載著世界最早的治便秘處方“蜜煎尋方”，另外在《金匱要略》中“甘草粉蜜湯”治療蛔蟲腹痛。晉代葛洪以蜂蜜治療燙傷和腿疾。南北朝時期，陶弘景用蜂蜜來美容與保健。姚僧桓在其醫方中提出以蜂臘配合豬肝與蛤粉治療夜盲症。現代醫學證實夜盲症是因為長期缺乏維生素 A 所致，而豬肝與蜂臘中皆含有豐富的維生素 A，每 100 克蜂臘中含有維生素 A 4000 單位。

名醫甄權認為蜂蜜是滋補劑，其《藥性論》中記有治口瘡蜜浸大青葉含之，治猝心痛及赤白痢以生薑與蜂蜜治之。醫藥學家孫思邈用蜂蜜治療咳嗽、氣喘、抗衰老。它提出治咳處方為：生薑 1000 克榨出薑汁，加蜂蜜 500 克煎成濃膏，如有氣喘可另外再加上杏仁。明代李時珍著《本草綱目》詳細記載蜂產品的治病處方。

名醫孫一奎在著書中收集了民間成蟲治病驗方，其中有用蜜蜂治療淋巴腺結核的驗方。方以智的《物理小識》記載著“藥蜂針”的配方與用法。取黃蜂的螫針加硫黃、冰片、麝香，置於瘡面上，以火點燃灸患部。

現代中醫中藥的專著，辭典有《中藥大辭典》、《中醫大辭典》、《中藥大全》、《中草藥大成》、《名醫名方大全》、《新編藥物學》、《中國藥典》等醫藥書籍中，也對蜂毒及蜂產品的藥性、藥理及臨床應用等作了詳細的記載。南京藥學院主編的《藥材學》(1990)詳細記載了蜂胎與蜂針的醫療功效和方法。南京醫藥大學醫學院院長房柱先生、張碧秋等學者長期從事蜂療的研究，著有《中國蜂針療法》(1993)，對蜂針與經絡全息做了詳細的論述。王金庸、王孟林主編的《中醫蜂療學》，詳細論述了蜜蜂產品的起源與作用，介紹了八十餘種常見病症的辨證論治

方法，開創了我國傳統醫學與現代醫學相結合的範例。葛風晨、孫哲賢主編了《蜂毒療法》2000年由吉林科學技術出版社出版。闡述了蜂毒治療各種疾病的規律及方法。李萬遙主編的《蜂毒療法》2002年由中國中醫藥出版社出版，以中醫病名為主的蜂針治療。陳述仁（廣州第一軍醫大學中醫教授）主編的《蜂針療法》生動的教學錄影帶、VCD等記錄了蜜蜂的生活型態與各種治療方針。另外還有許多國內外研究蜜蜂的學者都在為小小的蜜蜂能造福全世界病人而發聲。

三、蜂針療法的源流⁽²⁵⁾

《華盛頓郵報》報導科學家在美國紐澤西發現一塊琥珀中，發現一隻保存完整的八千萬年前的蜜蜂，科學家推測最原始的蜜蜂一定比八千萬年前更早。國外有學者指出歐洲或美洲等地都有人類使用蜜蜂治病的紀錄，顯示全世界的人類都發現了被蜜蜂針刺之後，不僅會疼痛還會減少許多疾病的症狀。推測蜂針療法的起源時間應該與養蜂人出現的時間吻合。

（一）中國的蜂針療法

人類對蜂針療法的認識是人們被蜜蜂螫針後，無意中發現某些疾病轉好開始，就有以毒攻毒的想法。中國古代蜂毒療法基本上都用蜂針螫刺，目前我國蜂針的臨床應用大致分三種類型：活蜂直刺型、全蜂肽治療法、蜂毒成份分離型。當然蜂毒成分的分離、提煉純化及合成是未來蜂毒治療的趨勢。隨著科技的日新月異，未來蜂肽的藥理作用一定會分化的更清楚，更特異性治療某些疾病，對人類健康會更多貢獻。

目前中國最早創設的蜂療醫院是由房柱先生1959年在連雲港市所建立，然後接連著在北京、瀋陽、武漢、成都、長沙、廣州等地開設了蜂療科、蜂療室。此外中國養蜂學會委員會也接連著建立，先後創辦了許多相關學術期刊，例：《中國養蜂》、《蜜蜂雜誌》、《養蜂科技》、《中國養蜂產品報》等學術期刊，促進蜂療的發展。不論是普通的養蜂人或是專家、教授都默默的為蜂療研究努力中，甚至

在廣州中醫藥大學醫院有蜂針療法專科，學者與專家都在努力著病人們研究能更專一治療某些疾病的蜂針療法。著名的廣州第一軍醫大學分校陳恕仁教授從事養蜂、蜂療工作，將醫療科學與教學融為一體，他用蜂針和蜂產品治療男性不孕症有很好的療效，並提出蜂肽療法作為治療癌症的第四大療法（癌症三大療法：化療、放療、手術切除）的大膽假設。

（二）國外的蜂針療法

古希臘科學家亞里士多德在他的動物學著作中有論述蜜蜂與其針刺，蜂螫治療在歐美流傳較久。1700 多年前古羅馬醫學家蓋倫記述蜂毒可用於止痛等多種用途。俄國沙皇伊凡雷帝曾用蜂螫治療痛風性關節炎。維也納醫師也發表過封毒治療風濕病的論文。1897 年布拉格大學朗格教授報告了蜂毒的化學成分和藥理作用。1899 年俄國學者發表了論文“蜂毒是種治療劑”。1935 年美國貝克博士撰寫了《蜂毒療法》。1941 年蘇聯教授出版了《蜂毒生物學作用和醫療應用》一書，使蜂毒治療進一步得到發展。在印度、日本、中國等地都分別召開了多次國際蜂療學術研討會，使蜂毒療法逐漸在世界得到交流。

在美國，帕特瓦格納醫師用“蜂毒療法”來治療多樣硬化症。多樣硬化症是一種人體免疫系統受到感染，導致神經系統受損的疾病。主要是以蜂毒來緩解多樣硬化症導致的肢體麻木和肌無力症。由於瓦格納的醫療並不是在診所內治療，因此許多人對此存疑。在華盛頓大學醫療中心，貝蘭蒂博士也在進行蜂毒療法，雖然目前研究階段蜂毒療法是一種安全無副作用的治療方法，但目前人體試驗人數太少，還不足以確認其效果。（中國科學院上海生命科學研究院生物訊息中心，2000）

（三）蜂療相關網址

蜂肽（bee venom）研究不斷的。隨著科技進步而日漸深入，不再只是民間口而相傳的傳統藥物，國內外都有為數眾多的學者爭相探討其治病機制。（蜂肽療法）將以嶄新的面貌竄升於世界醫療檯面上。蜂肽療法英文一般用

“Apitherapy”，或“bee venom therapy”。而“bee acupuncture”是只用蜜蜂的蜂蜜、花粉、蜂膠、蜂毒治療疾病。

國外網站-

1. 美國蜂療協會：www.apitherapy.org。
2. 蜂毒療法網址：www.apitherapy.com。

國內網站-

1. 福建蜂療醫院：www.fjsfkj.com。
2. 株洲市：www.apicultural-china.com。
3. 蘇氏蜂療網：ssfl.hxag.com。

四、蜜蜂的種類⁽²⁵⁾

蜜蜂在動物分類學上屬於節肢動物們、昆蟲綱、膜翅目、蜜蜂科、蜜蜂屬，蜜蜂屬有四個種（東方蜜蜂、西方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂），全都能分泌蜂蠟築巢，建有六角型巢房，社會化生活型態。蜜蜂屬的發源地在東南亞，自然分佈於各大洲，是因為 17 世紀之後的大航海時代將蜜蜂帶往世界各地。另外還有熊蜂屬、無刺蜂屬、變蜂屬，但這些蜂屬貯蜜量不多，品質酸劣，在本研究的討論並無直接意義。以下簡介幾種常見的蜜蜂：

（一）小蜜蜂（*Apis florea fabricius*）

小蜜蜂體長 7~8 毫米，體黑，頭略寬於胸，處於野生狀態，分布於廣西、雲南、印度、越南、斯里蘭卡、馬來西亞群島等地。

（二）大蜜蜂（*Apis dorsata fabricius*）

大蜜蜂體長 16~18 毫米，體黑細長，一般在樹叢築巢，分布於雲南、廣西、海南島、印度、日本、泰國、印度尼西亞等地。

(三) 中華蜜蜂 (*Apis cerana fabricius*, 1793)

中華蜜蜂是分佈在我國的東方蜜蜂的總稱，簡稱中蜂。中華蜜蜂屬於土著蜂，工蜂體長 10~13 毫米，蜂王 13~16 毫米，雄蜂 11~13 毫米，為中型蜜蜂。是中國南方常用於蜂針治療的蜜蜂且常被人們科學飼養，科學飼養有利也有弊。利處為可大量飼養，弊處為食物供應不足，可能會發生盜蜂的現象。目前大多為家養但也有野生。多築巢於洞穴中，主要分布於中國，蜜蜂分為蜂王、工蜂、雄蜂三類。

(四) 義大利蜂 (*Apis mellifera linnaeus*, 1758)

義大利蜂為西方蜜蜂的一個品種，學名為 *Apis mellifera ligustica* Spinola。源產於義大利的亞平寧半島，產於地中海。氣候條件特點為：冬季短、溫暖而溼潤，夏季炎熱花期長。是中國北方常用於蜂針治療的蜜蜂。工蜂體長 12~13 毫米，蜂王 16~17 毫米，雄蜂 14~16 毫米，為中型蜜蜂。工蜂類似中華蜜蜂，但體型稍長，又稱為黃金種蜜蜂。其生物學特性：產卵力強，育蟲結論平緩，抗病力弱，抗巢蟲力強。也是本實驗所使用的蜂胎蜂種。

(五) 印度蜜蜂 (*Apis cerana indica Fabricius*)

分布於喜馬拉雅山脈以南的印度、巴基斯坦、斯里蘭卡、緬甸、雲南等。工蜂體長 9~12 毫米，分為山地型與克什米爾型，平地產蜜量一年約五千克，山地年產蜜量約十五千克。能適應熱帶與亞熱帶氣候。

(六) 外國蜂

外國蜂又分歐洲、中東、非洲三大類群。中東和非洲蜜蜂又可區分為 12 個地理品種。另外還有一種非洲化的蜜蜂，是為非洲蜜蜂與歐洲蜜蜂雜交品種，適應熱帶氣候，性情凶暴，易螫刺人，繁殖力強，又稱殺人蜂。

工蜂的生活形態又區分為四階段：

幼齡期：出生後一到六天中不參加任何工作，自己找食物吃，慢慢參加保溫、打掃蜂巢、傳遞食物等工作。

青年期：出生六到十五天之間，此時能分泌大量蜂王漿，餵育幼蟲、蜂王、雄蜂。建造蜂巢、保衛蜂巢等工作。

壯年期：出生十六到四十天之間，主要擔任採集花粉、花蜜和樹膠等外勤工作，但也擔任防衛蜂巢、釀造花蜜等工作。

老年期：出生後四十天至死亡。此時身體上絨毛逐漸脫落，只能擔任採水採蜜等工作，老蜂易怒螫人。一般來說我們都用壯年期或老年期的蜜蜂來進行蜂針療法，此時蜂肽質與量都屬佳品。

五、蜂肽的特性與蜂針的結構

(一) 蜂針的結構：蜂針是位於蜜蜂尾部的自衛器官，工蜂的蜂刺是由產卵器演化特別而成的，屬於發育不全的雌蜂，雄蜂是沒有蜂針的。蜂肽是產生於工蜂的自衛防禦器官-蜂刺的毒液囊。蜂針器官由蜂刺部、貯毒液囊、鹼性腺等組成。每一蜜蜂針刺尾部外邊有一排彎曲倒鈎，是同一產卵器變形而來，並與毒腺相通，當工蜂的刺螫入身體後，由於倒鈎的關係，蜂刺不能自動拔出，只有將整體刺針連帶基部的毒囊等器官一起脫離蜂體，犧牲蜜蜂。蜂刺入身體後，還會支持刺針基部的肌肉等器官發動裝置作用之下，還會使蜂毒囊有節奏的收縮，使毒液不斷的排出，這就是在蜂針療法中，會將蜂針停留在身體一段時間以利蜂肽發揮更好的療效。

蜂肽的質量與蜜蜂的年齡、飼料的成分、蜂種的差異及季節密切相關。蜂針內蜂肽含量隨著蜜蜂年齡逐漸累積到一定的劑量，一般老年工蜂的蜂毒量最多，壯年工蜂次之，青年工蜂最小。另外是與蜂飼料成分、季節有關，有人研究指出有花粉的糖類飼料比單純餵糖水有利蜂肽液的生成。季節而言七月蜂肽平均量比

十一月還多。

(二) 蜂肽的特性：

1. 物理性質：蜂肽是一種味苦、辛而性平，氣味芬芳，無色或透明黃色液體。比重為 1.1313，pH 為 5.0~5.5，室溫下很快乾燥，一般蜂肽大約是一隻蜜蜂產 0.2~0.4 mg。一般蜂毒在氧化劑、強酸、強鹼的長時間加入作用下，會減低其活力，在腸胃消化酶作用下，很快被分解。一般保存在冰凍條件下，可保數年活性不變。
2. 化學成分：蜂肽化學成分非常複雜，經過許多研究之後，目前對其大多數成分有所了解。以毒性強度來說，以大胡蜂毒性最強。但蜂肽的提煉大多以蜜蜂為主。成分分成以下幾種：
 - A. 多肽類：melittin、MCD 多肽、心臟肽、鎮靜肽等多肽類。其中以 melittin 最有名，又稱蜂毒肽。是蜂肽中主成分，目前已知作用機制包括脂解酶的激活，產生二級傳訊因子，調節離子通道、鈣離子的調節、骨骼肌和心肌的收縮等。由於 melittin 結構簡單，有文獻指出可抑制病毒複製，也可用於癌症的基因治療及愛滋病的防治。⁽²⁷⁾
 - B. 酶類物質：蜂肽中有五十多種酶類，主要酶類有磷酸脂解酶 (PLA₂)、透明質酸酶 (hyaluronidase) 等具有很強的生物活性，能促進蜂肽在局部組織間滲透和擴散以及避免多肽被蛋白酶分解。
 - C. 生物胺類：含有多巴胺、組織胺、腐胺、精胺等生物胺類。
 - D. 酸類物質：蟻酸、脂肪酸、游離胺基酸等。
 - E. 其他物質：葡萄糖、果糖、卵磷脂、甘油、金屬元素、膽鹼、激素，維生素 C 等其他物質。
3. 毒理：蜂毒除了有治療作用外，還具有一定的副作用和不良反應。可能會使少數人過敏、蛋白尿⁽²⁸⁾、腎臟傷害⁽²⁹⁾。但是這些大多是黃蜂或馬蜂，超大量蜂毒作用下所產生的。實驗證明，

同時接受五百至一千隻蜜蜂的螫刺，才可能致人死亡，大多死因為中樞神經麻痺，或是循環衰竭。但一般蜂療中，一次僅 20 多隻蜜蜂螫針，除了初期過敏反應外，幾乎無致死之可能性存在。

4. 蜂毒之體內代謝：蜂毒可通過血液與淋巴液吸收，主要分布於四肢，腦組織很少。注射蜂肽 4 小時在糞便中達到高峰，12 小時體內基本上都消除了。
5. 蜂毒的採集方法：蜂肽是一種寶貴的天然藥物，人們初期都採用蜜蜂螫刺的方法，但是這樣做總會犧牲蜜蜂。目前已經有越來越多採蜂毒方法，且不傷害蜜蜂。才能永續取用。
 - A. 乙醚麻醉取毒法：蜜蜂在密閉空間中吸入乙醚之後，會引起吐蜜與排蜂毒現象，一定時間後打開蓋子讓蜜蜂飛走，收集底部的蜂毒。
 - B. 電取蜂毒法：以電流刺激蜜蜂腹部，使其收縮而排毒。所得的蜂毒也比乙醚法來的純淨。
 - C. 速凍是蜂毒採集：快速低溫會刺激蜜蜂排出蜂毒，而且不需犧牲蜜蜂。
 - D. 簡易取法：以尼龍布等物，用鑷子抓蜜蜂，讓其尾針在布上螫刺，再從布中取毒，不過量太少，無法生產用。

六、蜂肽針對各系統的影響

(一) 蜂針的針刺作用：蜂針的刺很短，屬於淺刺範圍。在《內經》中又分為半刺、毛刺、浮刺、直針刺。

(二) 蜂肽的毒理作用：除了蜂刺的短針刺激外，最主要的就是蜂肽的藥理作用。廣泛作用於各系統，如下：

A. 蜂肽針對心血管系統的作用：蜂肽具有疏通微血管，改善微循環作用。

有學者以蜂螫治療類風濕性關節炎對甲壁微循環觀察，結果顯示治療後紅血球流速與滲出有非常顯著性的提升，增加微血管開放，改善微小血栓的狀態⁽³⁰⁾。另外有學者發表蜂肽對心肌的作用與鈣離子有關，發現蜂毒肽可使心肌細胞內鈣離子濃度增加，因此可改善心臟冠狀動脈血流量⁽³¹⁾。蜂毒肽具有內皮依賴性舒張血管皮滑肌的作用，腎素釋出與 Na-Ca 離子交換通道可能參與蜂毒肽使內皮血管收縮⁽³²⁾。另外還有人發現蜂毒有明顯的降血壓作用，其對心血管的作用類似於組織胺，引起血管擴張、降血壓。促使組織胺釋放的成分主要有:melittin、PLA、MCD-多肽。Melittin 是毀壞肥大細胞而釋出組織胺；而 PLA 是促進卵磷脂轉變為溶血卵磷脂，而溶血卵磷脂再與肥大細胞融合而釋出組織胺；MCD-多肽則直接與肥大細胞膜上的鈣通道酸性側鏈基團產生反應，使肥大細胞釋出組織胺⁽³³⁾。

B. 蜂肽液有活血化瘀、通經活絡的作用。某些研究指出蜂毒肽可滲入到紅血球細胞膜上，不僅能降低紅血球的微黏度，增強其流動性，加大紅血球的親和性，達到活血化瘀的作用。

(三) 蜂肽對血液系統的作用

A. 蜂肽的溶血作用：蜂肽的溶血成分主要為 PLA 與 melittin，其中又以 melittin 最強。因為 melittin 會讓紅血球細胞膜通透性增強，胞內膠體大量滲出，紅血球因內部滲透壓降低而破裂。

B. 蜂肽的抗凝血與抗血栓作用:蜂肽主要的抗凝血機制為增加血管壁的通透性及促使肥大細胞釋放活性物質，進而影響多種凝血因子，達到抗凝血的效果^(34, 35)。另外還有實驗指出蜂肽會增加血小板中的鈣離子濃度，可能具有降血膽固醇，促進血液循環⁽³⁶⁾。

(四) 蜂肽對免疫系統的作用

蜂肽針有免疫調節的作用：melittin 與 apamin 能降低小鼠產生溶血素脾細胞量。但若小鼠去除腎上腺之後，蜂肽對齊免疫系統呈現刺激作用。推測

melittin 與 apamin 的作用機制是:刺激了腎上腺的相關皮質,增加了皮質激素的分泌,達到抑制免疫的作用⁽³⁷⁾。一般認為蜂肽中的 MCD-多肽能刺激肥大細胞且阻斷依賴性與鉀-鈣離子通道,但又有研究指出 MCD-多肽刺激肥大細胞的機制應與離子通道無關,而是通過 G protein 作用,引起細胞內磷脂酶 C 的活化而發生的⁽³⁸⁾。臨床上以蜂肽針治療類風濕、類風濕關節炎、僵直性脊椎炎,IgE 明顯升高,推測蜂肽可能是以競爭標靶細胞受體來作用。過敏性休克就與 IgE 有關,當細胞處於過敏狀態時,體內 IgE 就會升高,當同種抗原在進入體內時,會與肥大細胞與嗜鹼性白血球表面的 IgE 結合,然後白血球釋出組織胺等物質引起微血管通透性增加,平滑肌收縮,腺體分泌增加等反應。而接受蜂肽患者血中的 IgE 明顯增高,可對其細胞表面上的 IgE 受體有競爭作用。當下次病源入侵時,就沒有足夠的抗體可以結合,就無法刺激肥大細胞釋出發炎因子等反應物質,從而阻止了疾病的反應因子,抑制疾病惡化及休克的產生。另外還有研究指出蜂肽針可促進巨噬細胞分泌 TNF- α , TNF- α 與 T、B 細胞的激活有關,顯示蜂肽具有一定的免疫增強的效果⁽³⁹⁾。筆者寫到這裡,有鑑於 SARS、H1N1 等新型流感病毒之致病機轉也是引起人體內細胞激素風暴而導致死亡,大膽推測蜂肽可能可當成下一個抗流感明星藥物。

(五) 抗菌消炎作用：

蜂肽對多種革蘭氏陽性和陰性細菌都有抗菌作用,特別是陽性細菌。蜂肽在極低濃度就有殺菌作用 (0.5 $\mu\text{g/ml}$),可增加超氧歧化酶的作用,消除自由基,減輕發炎反應。目前已知蜂肽可明顯抑制鏈球菌、葡萄球菌、結核菌、傷寒桿菌、枯草桿菌的生長,對大腸桿菌、變形桿菌、綠膿桿菌則相對不敏感。研究發現蜂毒肽中的 N 端 A1-10 的片段勝肽具有廣泛抗菌作用與低溶血作用⁽⁴⁰⁾。

(六) 蜂肽針與消化系統：

melittin 不增加消化液的量,但可減少食物引起的胃液分泌,調節消化神

經，可用於胃分泌功能亢進病人。

(七) 蜂肽針與護肝：

蜂毒有預防肝纖維化的作用。病毒性肝炎病人有部份會轉為肝硬化，有研究以活蜂循經穴螫刺治療 B 型肝炎與 C 型肝炎的早期硬化有不錯的效果，也有研究用 CCl₄ 誘導大鼠肝纖維化，發現蜂肽有效抵抗肝纖維化作用⁽⁴¹⁾。另外也有研究認為蜂肽可以增強 THI 細胞功能來調節細胞免疫能力，具有延長血液凝固與抗血栓功用，也可有一定程度的抗纖維化及與抗肝硬化作用。臨床上蜂毒治療肝硬化已有滿意的效果⁽⁴²⁾。

(八) 蜂肽針與神經系統：

1. 蜂肽有很強的鎮痛作用，可用於各種神經痛。蜂肽中的安度拉平是前列腺素 E 的天然拮抗劑，關於蜂肽的鎮痛作用有許多研究成果。例如：蜂肽可以麻痺蛙運動神經及家兔角膜；從蜂肽中分離出的安度肽的鎮痛消炎效果比消炎藥還強。或者是蜂肽進入人體可以抑制大腦皮質支配區，可使病人很快緩解疼痛⁽⁴³⁾。

2. 蜂肽對中樞神經系統的影響：有研究指出蜂肽可誘導脊髓中的 c-fos 的表現，發現 melittin 可抑制大鼠自由活動與探求活動，apamin 可縮短巴比妥引起的睡眠反應⁽⁴⁴⁾。還有蜂肽可改變大腦皮層的生物電活性，尤其是蜂肽對 N-膽鹼受體有選擇性阻礙作用，可使中樞神經系統突觸內興奮傳導阻滯⁽⁴⁵⁾。也有實驗指出蜂肽具有明顯的中樞性菸鹼型膽鹼阻滯功能，先引起大腦皮層興奮，然後轉使皮層和皮層下結構抑制，其抗膽鹼作用不僅可抑制其中樞神經系統和自主神經，還能抑制周圍神經系統傳導衝動，這也就是大劑量的蜂肽會導致呼吸中樞麻痺，使人致死的原因⁽⁴⁶⁾。

(九) 蜂肽對關節和肌肉的影響：

注射蜂肽在已誘導關節炎的狗，發現蜂肽可以加強狗的骨骼肌運動行為。蜂肽中的 PLA₂ 也有直接興奮平滑肌的作用，因為蜂肽可抑制神經突觸部位的膽鹼脂酶的活動。melittin 可使盲腸基張力輕度且持久性的增加，且

能顯著的抑制 ATP 所引起的平滑肌鬆弛反應。此外，也有研究指出蜂肽對免疫型關節炎具有良好的抗炎作用⁽⁴⁷⁾。

(十) 內分泌與蜂肽：

一般認為蜂肽中的蜂毒素式通過刺激腦下垂體-腎上腺皮質系統，使腎上腺皮質激素和 ACTH 釋放增加，達到抗風濕、類風濕關節炎作用。國外有研究指出在 *in vitro* 實驗中發現蜂肽可以促大鼠腦下垂體中促腎上腺皮質素細胞釋放 ACTH 及腦內啡的影響⁽⁴⁸⁾。

(十一) 腫瘤與蜂肽：

蜂肽中主要抗腫瘤成分為 melittin 和 PLA₂。一般作用機制認為是使腫瘤細胞粒線體膜溶解，使細胞的正常呼吸受到抑制，因而腫瘤組織氧化磷酸化過程被抑制，氧化功能被破壞，導致生長抑制。目前有許多研究指出蜂肽抑制腫瘤細胞生長主要應該是經由細胞凋亡(apoptosis)途徑^(49, 50)。另外還有人證明蜂肽會激活 PLA₂，解除肝癌細胞缺氧現象；或蜂肽可插入 K562 細胞形成孔道，引起鈣離子內流，造成鈣離子濃度上升，細胞裂解等不同抗腫瘤理論⁽⁵¹⁾，但皆證明一件事情，那就是蜂肽可以抗癌，有望可以成為未來抗腫瘤的標靶治療。

(十一) 蜂肽的抗輻射作用：

研究指出當以 X 射線或 γ 射線照射小鼠時，提前給皮下或腹腔注射蜂毒，可提高其存活率。目前認為抗輻射機制為蜂毒刺激有機體產生適應能力，增強造血功能，減少骨髓和脾臟的退化性改變，保護和恢復造血細胞能力⁽⁵²⁾。1970 年日本宮野岩以鈷 60 做照射源，證實蜂毒有抗 γ 射線的作用，增強有機體抗輻射作用。

七、蜂肽針療法的臨床相關研究

蜂針療法是一種民間療法一直被用來治療風濕性關節炎，近年來隨著科技進步，對蜂毒的研究越來越深入，許多醫師與學者對蜂針療法興趣高昂，也有越來越多研究指出，蜂肽可對付愛滋病、癌症、多發性僵直症等疑難雜症。可望蜂肽通過臨床觀察與研究，造福更多的人類。

(一) 蜂肽針的臨床治療

1. 蜂肽與 AIDS：

病毒專家發現愛滋病毒的化學結構類似蜂毒的化學結構，故蜂肽當成破壞愛滋病毒的促進劑，阻止病毒的擴散⁽⁵³⁾。並且減少 70% 的基因轉錄，使病毒生長降低 99%，與其他抗愛滋藥物相比，蜂毒的好處是從基因層面就抑制病毒的產生，以期許蜂肽與其藥物結合使用，達到更好的治癒率。

2. 多發性僵直症與蜂肽：

目前對多發性僵直症的認知是基因序列的不完整，造成許多 20~40 歲的中壯年發病。也有研究認為他是病毒慢性感染引起，使神經產生絕緣反應，脊髓鞘受到傷害，導致腦和脊髓的神經產生錯誤的神經傳導。美國蜂療家姆拉茲 1993 年指出他用蜂毒治療了兩名罹患此症的婦女，得到很好的成效，但由於他並非在醫院治療，故成效與確切機制依舊不明確。

3. 蜂肽治療癌症：

澳洲蜜蜂雜誌 1995 年指出蜂毒能與瞄準癌細胞的複製化學鍵結合，以便找出同時殺死癌細胞，而不傷害正常細胞。

4. 蜂針治療痛症：

蜂針鎮痛作用很強，對各種神經痛都有一定效果。，擴張微血管、改善微循環與止痛作用、同時抑制 PGE₂ 合成，其中多肽成分可直接抑制發癢作用，可興奮腦下垂體-腎上腺皮質系統，使 ACTH 分泌增多而有抗發炎效果⁽⁵⁴⁾。

5. 風濕病與蜂針：

蜂毒之所以能治療風濕性疾病 (RA)，主要取決於它具有多種藥理作用。蜂毒具有類箭毒素及神經阻斷劑作用，並含有多肽神經毒素，可有效止痛、降地血栓素的功效，改善微循環而達到舒緩關節的作用⁽⁵⁵⁾。目前治療方法有活蜂螫刺法與精製蜂毒注射液依穴位注射，皆達到顯著的治療效果。黏蛋白有效降低 67.9%與類風濕因子阻降率 58.3%⁽⁵⁶⁾；利用蜂肽針治療 RA，使偏高的 IgG、IgM 下降，說明蜂肽可調節免疫功能；也有研究指出蜂療後血漿及誘導單核球 (PBMC) 產生的 IL-2 明顯增高，IL-4 明顯降低⁽⁵⁷⁾，蜂肽可增強 CD₄⁺細胞的 TH1 細胞功能，調節免疫功能。綜合來說蜂肽可治療風濕病的治病作用可能與以下有關:1.直接抗發炎作用-MCD 多肽皮下注射可顯著抗發炎。2.間接抗發炎作用-蜂肽中其他多肽類可促進腦垂體前頁分泌 ACTH，而達到抗炎作用。3.抗凝血、血栓-擴張微血管、改善微循環。4.對神經系統-具有神經阻斷的功能。

6. 其他蜂針相關動物實驗：

有研究指出蜂毒就有免疫調節作用是經由增強 TH1 淋巴細胞功能，降低 TH2 淋巴細胞功能，達到抗過敏、抗發炎、抗腫瘤等效果⁽⁵⁸⁾；此外還有實驗指出蜂毒肽可以改變細胞膜的流動性，降低血液黏度，而有活血化瘀的作用；或是蜂針治療大鼠關節炎滑膜細胞，發現可以抑制滑膜發炎

的症狀⁽⁵⁹⁾，或是抑制關節炎所引起的關節腫脹等研究成果⁽⁶⁰⁾。

八、蜂針療法

(一) 蜂針治療原則：

在中醫治療中，疾病有寒熱虛實，蜂針治療當然應該辯證論治。要合理選擇蜂種，根據不同病症，針刺不同穴位、針刺量與次數都需酌情使用。主要有三大原則：調和陰陽、補虛瀉實、分清標本。

1. 調和陰陽：中醫認為疾病發生之根本原因為陰陽失調，用針致病之作用就在於調節陰陽的盛衰，使個體達到陰平陽秘的作用。
2. 補虛瀉實：治病要因人而宜，根據不同人的身體狀態、虛實情況進行治療。虛：是指人體的正氣不足，實：是指疾病的邪氣旺盛。《靈樞·九針十二原》說：凡用針者，虛則實之，滿則瀉之。利用平補平瀉為下針之治療原則。
3. 分清標本：標與本是相對的概念，如：正氣為本，邪氣為標。病因為標，症狀為本。標，屬於疾病的現象；本，疾病的本質。一般來說，急則治其標，緩則治其本。從事蜂針穴位治療時，要同時治療局部病，也要調養身體體質，以提高療效。

(二) 蜂針取穴原則：

1. 遠部取穴
2. 近部取穴

3. 隨症取穴

4. 依神經節段取穴

5. 按時取穴

(三) 蜂針治療操作方法：

A. 活蜂針刺法

1. 蜜蜂的選擇-一般選用中華蜜蜂與義大利蜂，因為野蜂的毒液成分不盡相同，也比較容易導致過敏。身體尾部較黑的為老蜂，蜂毒成分含量較高。
2. 蜂針療法的準備-紗網、防蜂裝，鑷子、蜂療控制器等等裝備準備齊全。
3. 試針法的應用-患者初步接受蜂針療法，我們會先用蜂針注入蜂毒在病患的皮膚，以觀察是否有嚴重的過敏反應。試針的目的是防止蜂療對少數人會產生危害生命的過敏反應，大部分的人的蜂螫處都沒有明顯的過敏反應，除了少數人會產生大於 10 cm 以上的紅腫，那醫師便會停止蜂療。
4. 過敏反應的處理-如果只是局部紅腫，並無危害生命便不須處理。若發生過敏性休克，則需急救。病情較輕者對人中、內關、足三里指壓即可，若病情較重者應酌情注射腎上腺素與生理食鹽水。
5. 蜂針刺法-分為直刺法、散刺法、點刺法、減毒蜂刺法、出針、蜂針刺激量。

B. 蜂毒治療法

雖然民間常用活蜂直刺法，蛋活蜂螫刺治病副作用比較大，患者表皮也較疼痛，也較難控制蜂毒的用量。蜂肽屬於生物藥品，目前都提倡用蜂毒提取液，蜂毒制劑，比較好控制用量且了解病情。

1. 蜂毒制劑：20 世紀初國外就有蜂毒制劑的產生，但蜂毒制劑在其製作過程中會有些揮發性物質會流失，希望在未來科技發展中，能將蜂毒制劑做得更全面、更完善。目前中國有些地方已經有在生產蜂毒注射液。房柱先生癌制的蜂毒制劑“風濕安”是類白色的粉末，由安徽四海藥廠生產；德國生產的粉針劑與軟膏，“apisauthron”，“forapin”。蘇聯捷克都有生產相關蜂毒藥劑。臨床研究證明蜂毒制劑有抗發炎與鎮痛的作用。
2. 蜂毒治療法：可分為蜂毒制劑注射療法、蜂毒電離子導入法、蜂毒超音波導入法、蜂毒霧化吸入法、蜂毒軟膏及外用擦劑、蜂毒口服制劑等治療法。
3. 蜂肽針治療作用：蜂針本身是天然的注射器，與目前最先進的注射器相比，甚至還略勝一籌。當蜂針接觸到外物，蜂刺脫落蜂體，螫針器官發動裝置作用下。毒囊會繼續有節奏的收縮，持續將蜂毒液注入。蜂針作用於人體主要有以下的功用-標本同治、消炎止痛、疏經通絡、活血化瘀、雙向調節的功能。

(四) 蜂毒治療的適應症與禁忌症

蜂針療法是將蜂毒的藥理作用與針灸學相結合的療法，臨床以探明蜂針療法對於類風濕性關節炎、風濕性關節炎、僵直性脊椎炎、神經痛等疾病，基本上針灸的適應症，蜂針療法皆可應用。

A. 適應症：神經、肌肉系統疾病、變態反應與免疫性疾病、骨頭疾病、

內科疾病、外科、婦科、兒科、家醫科、皮膚科等疾病

- B. 禁忌症：心肺功能衰竭者、肝腎功能障礙者、嚴重過敏反應、嚴重動脈硬化、月經期、孕婦、手術後也須慎用、淋巴結腫大、血壓過高者也禁用。

(五) 蜂針不良反應之防治方法

蜂針過敏屬於特異性過敏反應。大部分患者不會有過敏反應，只有患部紅腫熱痛，因為蜂肽是大分子物質，容易引起肥大細胞釋出組織胺。少數人會有嚴重過敏反應，具體方法為如下：

1. 立刻阻止蜂針液繼續注入與中和蜂毒-因蜂毒呈酸性，故應用小蘇打溶液洗敷患部以中和毒液。
2. 輸液。以中和、稀釋及促進蜂毒的排出-輕者大量飲水，促使蜂毒盡快排出、重者可輸入葡萄糖溶液、生理食鹽水。
3. 防治疼痛的方法-給患者治療的醫師在治療時應盡量輕巧，避免讓病人疼痛。目前也有常用的減痛法：塗抹皮膚止痛制劑，或以點刺、散刺來治療，局部冰敷或用中藥止痛。
4. 減少紅腫的方法-以鹼性物質減少蜂毒的酸性。
5. 防治搔癢、風疹的方法-一般用百花油、中草藥、蜂蜜外塗等止癢法。中藥可用：防風、浮萍、蟬衣、生地、丹平等藥物，更嚴重者而感染者以抗生素治療。
6. 防治發熱的方法-多喝溫開水、蜜糖水、促使蜂毒反應物儘快排

出。

7. 防治暈針、休克的方法-先小量的蜂針，觀察患者其過敏反應，嚴格控制蜂量。以免患者產生暈眩之反應。
8. 肝腎功能損害誤用-因蜂毒需要肝臟來代謝，如果肝臟失去功能，避免患者的傷害。
9. 蜂針治療脫敏法-試針時，若患部紅腫大於 10 cm，即停止繼續治療。脫敏法是一種自動免疫療法，其作用機制是促使患者抗蜂毒的 IgG 抗體增加，此 IgG 抗體會阻滯抗體與 IgE 抗體相對抗的抗原抗體反應。

(六) 蜂針治療注意事項⁽⁴⁾

1. 注意治療的時間與部位-依患者需求針治
2. 嚴格控制使用的蜂針量-任何藥物，多者為毒，少者為藥
3. 防治不良反應-治療前應消除病人的緊張感、低血糖、大汗等不適症狀。
4. 嚴重過敏者-立即送醫治療。
5. 注意蜂針的種類不同-不同蜂種的蜂毒量不同，過敏物質也不同。
6. 正確對待過敏反應-正常的過敏反應，醫者應堅持治療，取得療效。

蜂針療法對過敏反應的輕重，通常取決於人體本身的內在因素，體質或基因不同。而不是療效好壞的指標。過敏反應的輕重可以做為掌握治療時間或針刺數量的依據，臨床上只要嚴格遵守蜂針療法的操作原則，使用蜂針療法是很安全的。

第三節、細胞死亡

當細胞受到外力影響，像是：藥物、生長環境改變、傷害胞器……等等，可能胞內的 DNA 與胞器可能受到傷害，然後細胞會去修補傷害，直到傷害太過嚴重而無法修補，最後細胞才會走向死亡。細胞死亡又分為兩種，1.程序性死亡：又分為細胞凋亡 (apoptosis)與自體吞噬 (autophagy)⁽⁶¹⁾、2.細胞壞死 (necrosis)。細胞凋亡早期，細胞會先產生皺縮、染色體凝集、DNA 斷裂，但其胞器仍是完整的。到了晚期，細胞膜會皺縮呈不規則狀，最後會形成凋亡小體，但細胞膜仍是完整的。細胞壞死早期細胞內胞器會脹大如：粒腺體成不正常腫大，細胞膜也會破裂，到晚期細胞膜也會破裂，因而釋放一些發炎物質而引起局部發炎反應，傷害到鄰近的細胞和組織。

目前細胞死亡有以下相關途徑：

一、Caspase 家族蛋白：

細胞凋亡時又可區分為caspase依賴性和caspase非依賴性⁽⁶²⁾，細胞內會有一系列的蛋白水解酵素 (Cysteine dependent aspartate specific protease) 被活化進而裂解及活化其他細胞酵素。正常生理狀態下，細胞中的caspase處於不活化狀態，直到凋亡訊息啟動後產生自我分解而被活化，又利用本身的酵素活性活化下一個caspase，又再進一步分解其他pro-caspase，啟動一連串的訊息傳導- caspase cascade，導致細胞凋亡的發生。

Caspase相關作用功能如下：^(63, 64)

- (1) 可造成細胞週期停滯及水解DNA和細胞骨架
- (2) 抑制XIAP作用，XIAP是一種apoptosis抑制者
- (3) 將細胞內PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) 裂解

Caspase 非依賴性路徑顧名思義不經由 caspase 傳遞訊息，而是藉由：apoptosis-inducing factor (AIF)、Endonuclease G (Endo G) 來傳遞細胞凋亡訊息⁽⁶⁵⁾。AIF、Endo-G 會進入細胞核中造成 genome digestion 且屬於

caspase-independent pathway 誘發細胞凋亡⁽⁶⁶⁾。

二、粒線體相關路徑：

1. 內在路徑 (intrinsic pathway)：

當細胞受到外力影響時，有可能會改變內質網或粒線體的正常功能代謝，像是刺激內質網產生壓力釋出鈣離子訊息傳導 (Ca^{2+} signaling) 進而誘導細胞死亡；或是粒線體會藉由 Bcl-2 family protein 調節粒線體內膜 (intermembrane space) 釋放凋亡相關蛋白 ex: cytochrome *c*、AIF、Endo-G 等到細胞質，改變粒線體外膜 (outer membrane) 滲透性，造成粒線體膜電位的下降。cytochrome *c* 會活化下游 caspase-9 然後水解其他細胞凋亡蛋白造成走向 apoptosis。在 mitochondrial pathway 中，Bcl-2 family protein 為其最重要的調節者。Bcl-2 family protein 具有 Bcl-2 homology (BH) domains，分別命名為 BH1、BH2、BH3、BH4，彼此之間在細胞凋亡之間又扮演不同的角色⁽⁶⁷⁾。可分為抑制凋亡 (anti-apoptosis) 及促進凋亡 (pro-apoptosis)。

Anti- apoptosis members：Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 等，這些分子在細胞受到凋亡刺激時，可維持粒線體膜的完整性，防止 cytochrome *c* 釋放至細胞質；Pro-apoptosis members：Bax、Bad、Bid、Bak、Bcl-xs、Bim 等，這些分子在細胞受到凋亡刺激時。會由細胞內不同腔室移轉到粒線體。當細胞發生 DNA damage 時，會活化 pro-apoptosis members— Bax 及 Bak 轉位 (translocation) 從細胞質移到粒線體外膜，誘導粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 改變，釋放凋亡相關蛋白因子⁽⁶⁸⁾；anti-apoptosis members 如：Bcl-2 會維持粒線體的完整而有效抑制 cytochrome *c* 從粒線體釋出，而粒線體內容物的是被認為與粒線體膜上的粒線體滲透性轉運孔通道 (MPTP) 有關，此通道為 PTPC 蛋白質複合體，他是由外膜 VDAC、hexokinase、creatine kinase (CK)、peripheral benzodiazepine receptor (PBR)、內膜 ANT 和 cyclophilin D 構成⁽⁶⁹⁾，若此通道打開會造成粒線體內膜兩側的 H^+ 梯度消失、粒線體膜電位下降、matrix 滲透壓增高，造成粒線體漲大⁽⁷⁰⁾。Bax 可與 PTPC 一起作用使 PTP 通透性增加，繼而釋放

cytochrome *c*⁽⁷¹⁾。或是當粒線體面臨過多的鈣離子累積；粒線體氧化壓力增加或膜電位下降，都會打開MPTP因而引發粒線體膜上的凋亡相關蛋白的釋放。例如：cytochrome *c*、AIF和Endo G且引發下游caspases反應，使細胞走向細胞凋亡。另外還有一群蛋白分子稱為IAPs，具有高度保留性存在各種物種中，人類的IAPs主要有XIAP、c-IAP1等，他們會抑制caspase-3、-7和-9。其中以XIAP在細胞凋亡中抑制caspase最顯著，阻止凋亡小體的形成⁽⁷²⁾。AIF是一種flavoprotein，當細胞走向凋亡過程中，AIF會從粒線體釋出至細胞質中，再轉位入細胞核中，啟動caspase-independent pathway，使染色質濃縮、粒線體膜電位去極化，最後使細胞走向凋亡⁽⁷³⁾。有研究指出，當細胞內鈣離子濃度增加時會促使粒線體釋出AIF，造成細胞凋亡的啟動⁽⁷⁴⁾。

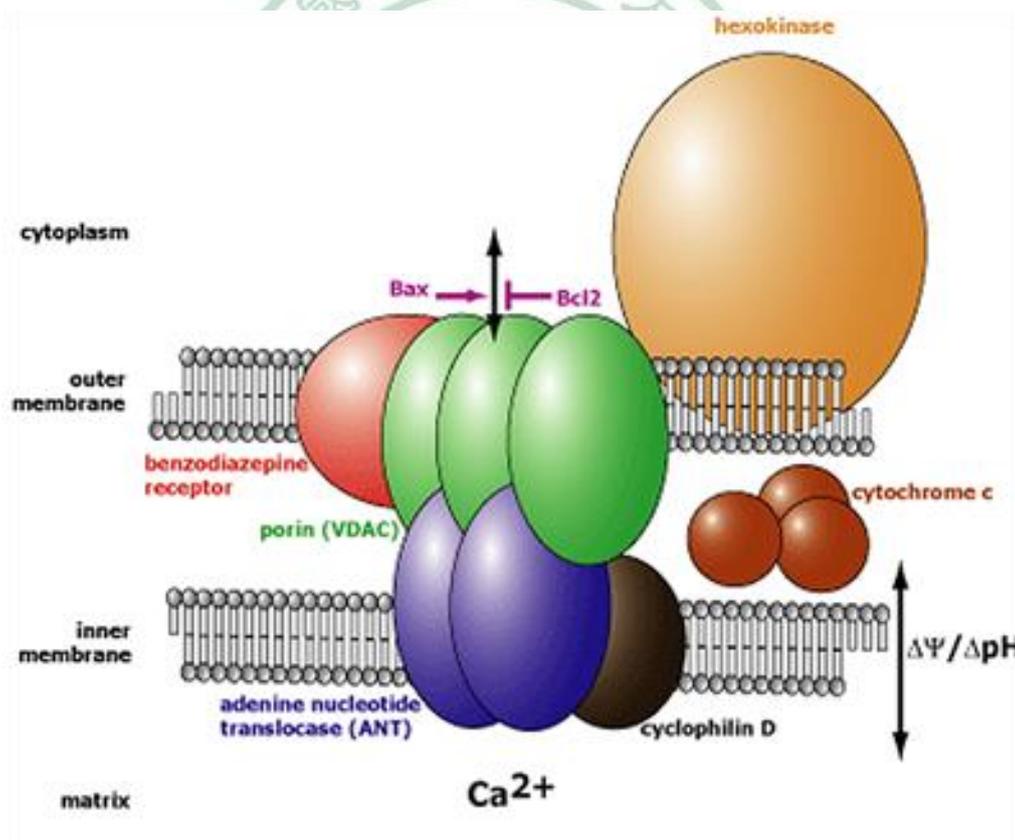


圖2-4 粒線體MPTP組成結構示意圖⁽⁷⁵⁾

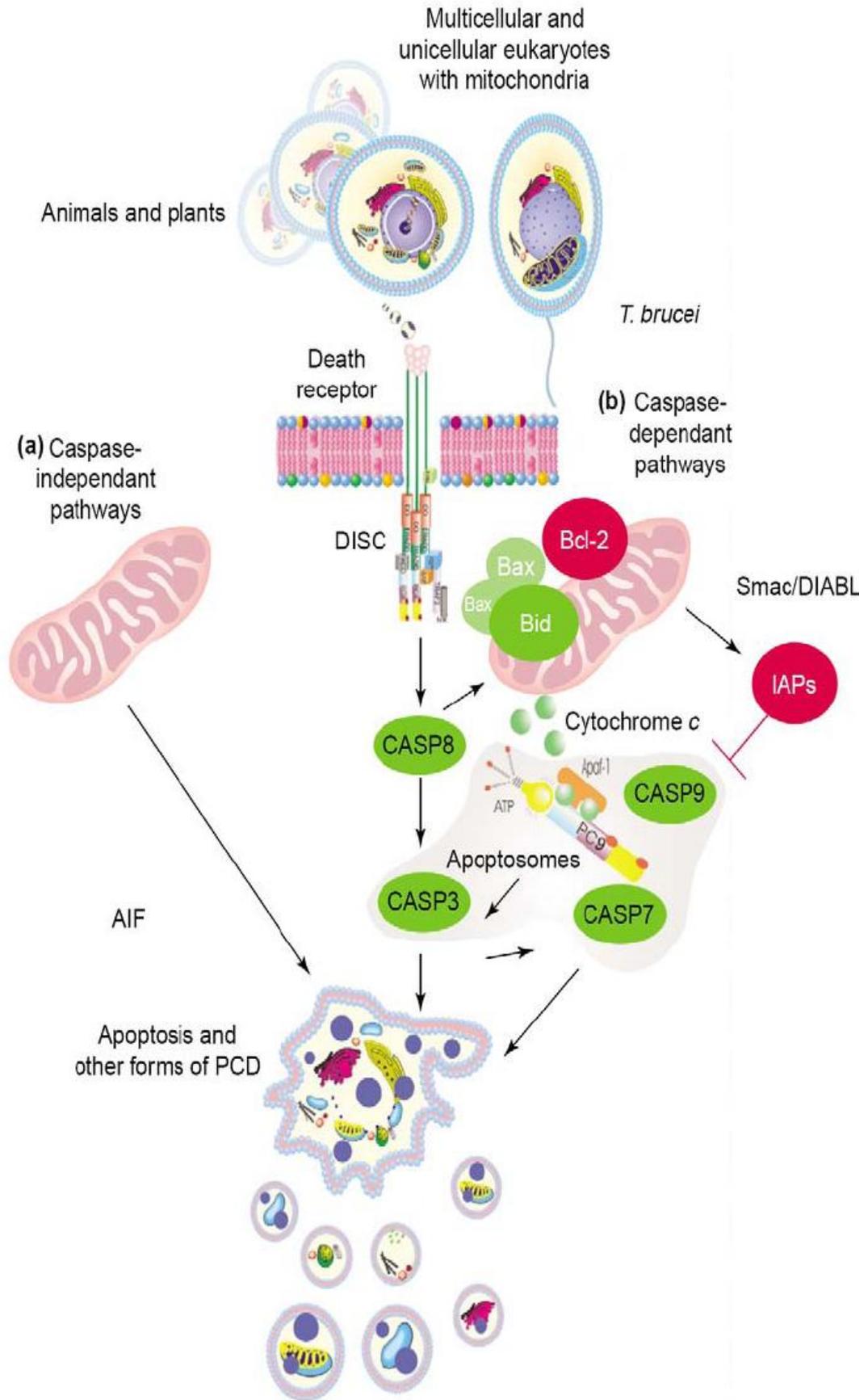


圖 2-5 粒線體在細胞凋亡路徑中扮演的角色⁽⁶⁶⁾

2. 外在路徑 (extrinsic pathway) :

外在路徑又稱死亡受器路徑，目前有6種死亡受體接受器被發現-Fas (CD95)、tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1)、tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor (TRAIL-R1 or DR4)、TRAIL-R2 (DR5)、Death receptor 3 (DR3)、Death receptor 6 (DR6)⁽⁷⁶⁾。主要是經由活化細胞膜上的死亡受器蛋白，死亡受器蛋白會其配體連結，再裂解活化caspase-8，再活化caspase-3，造成細胞走向凋亡。

另一方面caspase-8也會活化Bid，Bid會再轉位至粒線體上，導致粒線體膜電位下降，造成細胞死亡⁽⁷⁶⁾。

表 2-2-2 死亡受器與其配體以及相關連接蛋白⁽⁷⁶⁾

Table 1 Death receptors and their ligands and apical adaptors

Receptor	HUGO ^a	Ligand	HUGO	Pivotal adaptor
TNFR1	TNFRSF1A	TNF, LT α	TNF, TNFB	TRADD
CD95 (Fas)	FAS	CD95L	FASLG	FADD
DR3	TNFRSF25	TL1A	TNFSF15	TRADD
DR4 (TRAILR1)	TNFRSF10A	Apo2L/TRAIL	TNFSF10	FADD
DR5 (TRAILR2)	TNFRSF10B	Apo2L/TRAIL	TNFSF10	FADD
DR6	TNFRSF21	?		TRADD?

Reviewed in refs. 2,6.

^aAssigned by the HUGO gene nomenclature committee (<http://www.genenames.org>).

三、內質網壓力(ER stress)：

內質網壓力路徑與細胞死亡

內質網在細胞內調控著許多細胞內生理現象，像是胞內鈣離子濃度的調節、蛋白質分泌及脂質合成、細胞訊息傳遞。隨著越來越多人類疾病被發現可能與內質網壓力相關。但詳細的分子機制並未十分明朗，故本實驗想要探討內質網與癌細胞凋亡的機制，期許能為抑癌藥物研發治療領域提供更多可能的治療戰略方向。內質網內腔擁有特殊的細胞環境，有著最高濃度的鈣離子濃度以及許多Ca²⁺-ATPase轉運蛋白，另外還有許多鈣離子相關的分子伴護質(chaperone)：GRP78-HSP70、GRP94-HSP90，這些蛋白可以幫助其他蛋白穩定摺疊成形。若是細胞受到許多外界因素干擾或壓力(ex：缺氧、氧化傷害、高油脂飲食、高血糖症、病毒感染...等等)，將會造成內質網上堆積許多未折疊完全的蛋白質(unfolded protein)，而這些未成熟的蛋白質將會對細胞形成壓力並產生一種稱作未摺疊蛋白反應UPR(unfolded protein response)⁽⁷⁷⁾，ER stress所誘發的UPR又分為三種effector功能：適應反應、警告反應、細胞凋亡⁽⁷⁸⁾。一開始的是想要維持ER內的恆定與功能，適應機制會活化轉錄程式並誘導UPR這些基因的表現來提高ER內蛋白質的摺疊的能力以及ER相關基因的降解(ER-assisted degradation-ERAD)，來幫助ER內未折疊蛋白的釋出與降解。轉位的mRNA在一開始的幾個小時會阻擋新的蛋白進入ER中，直到這些mRNA將UPR蛋白譯碼完全後。適應反應在某些細胞特別旺盛，如：胰臟β細胞、漿細胞、肝細胞⁽⁷⁹⁾。接著是ER所誘發的警告反應則與許多訊息傳遞路徑有關，可能會活化mitogen-activated protein kinases (MAPKs)，Jun N-terminal kinase (JNK)，p38 MAPK，nuclear factor-κB (NF-κB)。最後ER stress所誘導的細胞死亡或凋亡可能是經由caspase-dependent apoptosis and caspase-independent necrosis。

此外ER stress也會誘發細胞自體吞噬作用⁽⁸⁰⁾，在這裡我們探討UPR訊息傳遞在細胞凋亡中各相關蛋白之表現量。當內質網中的未摺疊蛋白累積越多，便會產

生GRP78這類伴護質幫助蛋白質摺疊。當GRP78釋出即會啟動UPR。當UPR啟動後可能直接活化一些未摺疊完全蛋白質。像PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6)、inositol-requiring kinase1 (IRE1)，這些重要的轉膜訊息蛋白在ER stress下也有改善蛋白質摺疊錯誤的功能。IRE1 α 可活化caspase-4以及轉錄後修飾XBP-1蛋白的表現，還有caspase-4已被當成是ER stress-induced apoptosis的重要指標，最後造成細胞自體吞噬 (autophagy)而死亡⁽⁸¹⁾。ATF4, XBP1 and ATF6這些蛋白都在C/EBP homologous protein (CHOP)-GADD153的基因上轉碼，而CHOP又調節著Bim、Bcl-2基因的表現。且p38 MAPK、JNK也都可調控CHOP的活性^(82, 83)，故內質網確實與細胞死亡有非常密切的關係。

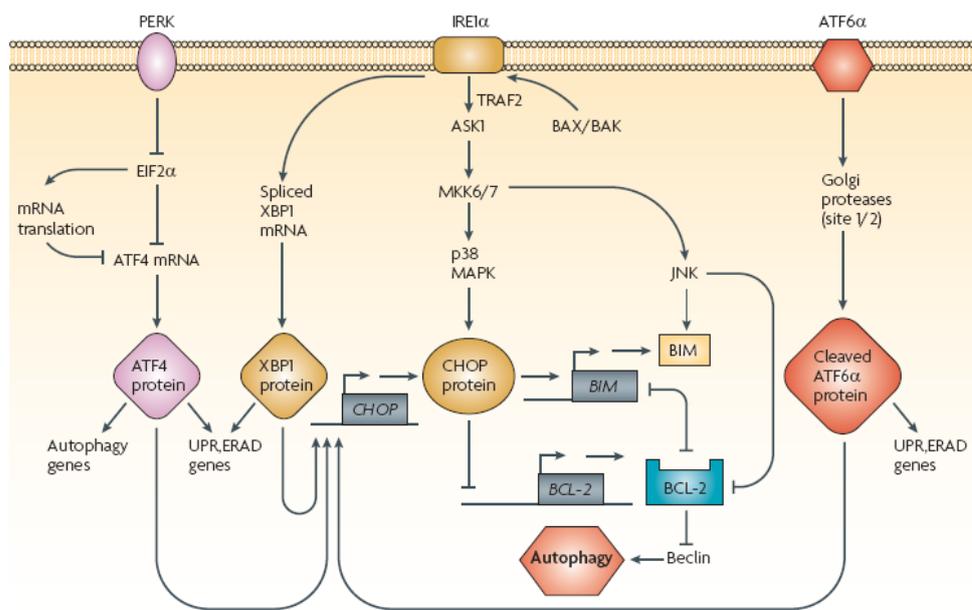


圖 2-6 內質網壓力下，UPR (unfolded protein response)相關訊息傳導路徑。⁽⁸⁴⁾

第四節、鈣離子訊息傳導與癌細胞存活

細胞內鈣離子濃度升高被許多研究指出調控著許多細胞訊息機制，像是：細胞增殖 (cell proliferation)、細胞週期過程 (cell cycle progression)、細胞凋亡 (apoptosis)、致癌基因訊息傳導 (oncogene signaling).....等等。鈣離子除了在細胞訊息傳導中，扮演著次級訊息傳遞者的角色之外，許多癌細胞研究也在研究鈣離子在啟動各種訊息傳導路徑中扮演不同的角色。鈣離子主要儲存於細胞的內質網與高基氏體中(>1 μM)，一般細胞質中的鈣離子濃度大約只有 100 nM。ER 上面的有鈣離子貯存蛋白 (GRP78、HSPA5)，與膜上轉運幫浦 (SERCA、PMCA)，以及鈣離子感受器與反應器 (calmodulin、PKC)。調控著許多胞內的鈣離子濃度與細胞生理機制以及各種基因的表現，影響細胞生長與增生⁽⁸⁵⁾。若是內質網受到外來壓力的影響，就會釋出大量的鈣離子去影響到粒線體膜電位 (Mitochondria membrane potential; $\Delta\Psi_m$)使粒線體膜電位下降，Cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質，接著造成了細胞走向 caspase-9 dependent apoptosis pathway⁽⁸⁵⁾。

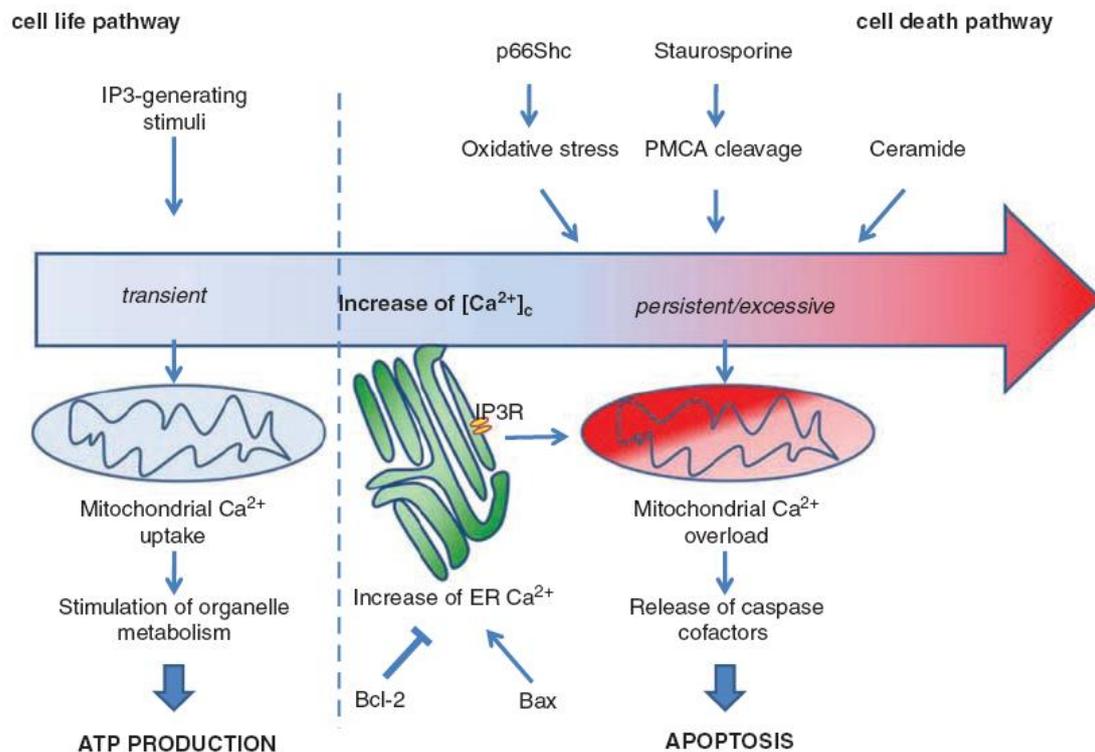


圖 2-7 胞內鈣離子與細胞死亡之關係圖。⁽⁸⁵⁾

另外鈣離子也會調控細胞週期，尤其是 G1 早期，在 G1 與 G2/M 的交界處，對細胞內鈣離子濃度的改變非常敏感。對 G1 早期的一些基因 (FOS, JUN, MYC) 的表現來說，鈣離子濃度是影響深遠的。甚至有研究做 CaM 的抑制劑，發現確實可以使細胞停滯在 G1 晚期，同時抑制了 cyclin D1、CDK4/2 的表現，提高了 p21、p27 的表現，調控 Ras 下游訊息傳導路徑。證實了鈣離子確實影響細胞週期的進行⁽⁸⁶⁾。

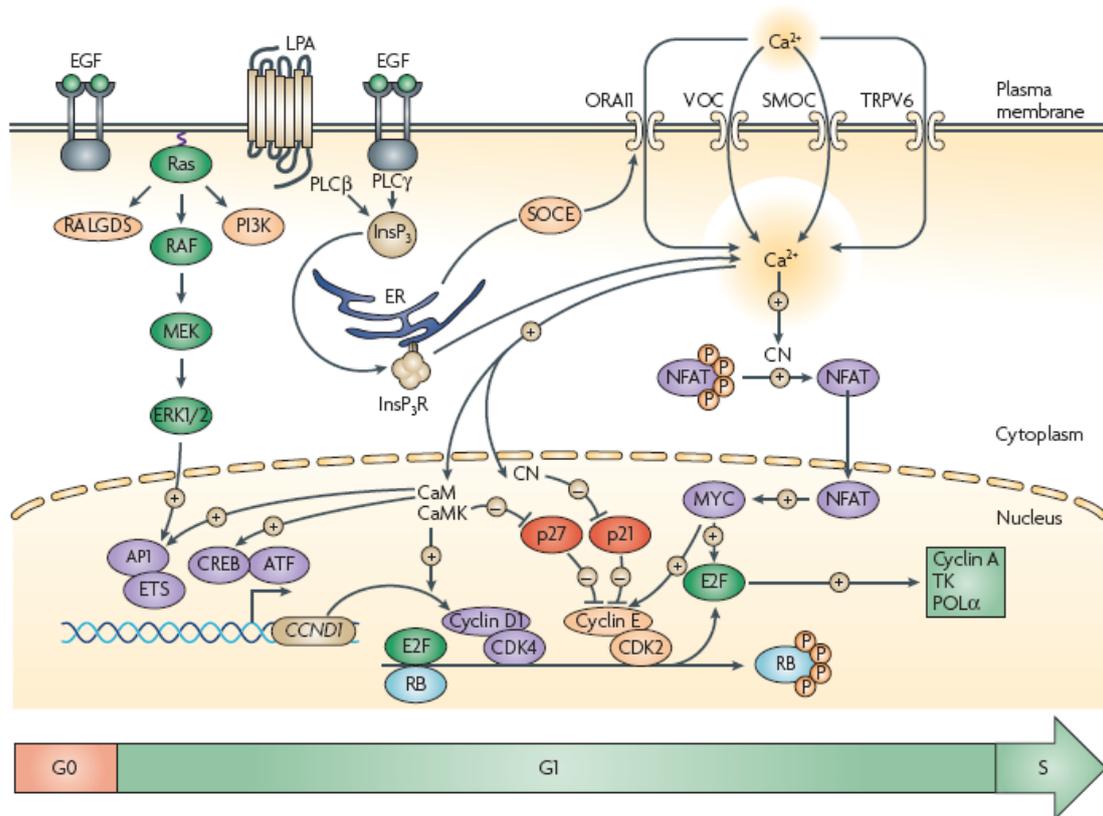


圖 2-8 鈣離子對細胞週期相關蛋白的影響。⁽⁸⁵⁾

第五節、細胞週期與細胞凋亡

細胞週期是指各次細胞分裂之間的過程，包括 G₀/G₁、S、G₂、M 四期，另外還有一個獨立出來的 Sub-G₁ 期，也就是細胞準備走向凋亡的準備期。上個章節談到鈣離子也可調控細胞週期，但可以調控細胞週期的主因可不只有鈣離子。目前人們發現的細胞週期調控因子很多，可歸納三大類：(1) 細胞週期素 (cyclins)、(2) 細胞週期素依賴性激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs)、(3) CDK 抑制蛋白 (cyclin dependent kinase inhibitor proteins, CKIs)。CDKs 是細胞週期調控的重要一員，而 Cyclins 是 CDKs 的正向調節因子，能啟動 CDK 活性；CKIs 是負向調節因子，可抑制 CDK 活性。我們現在從 CDKs 及下游調節蛋白、Cyclins 和 CKIs 三方面討論細胞週期調控因數在細胞週期調節中的作用⁽⁸⁷⁾。

細胞週期調控是在各期的控制點(check points)上進行的。細胞週期中存在兩個重要的控制點：一個位於 G₁/S 交界處，稱做 G₁ check points，主要是來檢查細胞的大小、營養、各種生長因子及 DNA 是否受損；另一個位於 G₂/M 交界處，稱做 G₂ check points，主要在檢查細胞的大小和 DNA 在轉譯過程中是否完整與準確，才可以進行複製或分裂。若 DNA 受損，細胞週期便無法繼續往下進入下一個週期 (Cell cycle arrest)，若無法修補，Chk1/2、p53 等訊息傳導極可能使細胞走向細胞凋亡。

一、CDKs complex 與相關蛋白

活化的 CDK 與 cyclin 會形成一個複合體，才會有活性功能。其中 CDK4/6 會與 cyclin D 結合、CDK2 會與 cyclin E 結合，之後目前已發現的 CDK 至少有九種，分別命名為 CDC2(CDK1)、CDK2~CDK9，CDK 被啟動後，可使其下游蛋白發生磷酸化。

哺乳動物細胞中，p21 的功能至少有兩方面：可以抑制 CDK 的活性，另一個是能結合和抑制增殖細胞核抗原 (PCNA)，從而抑制 DNA 的複製⁽⁸⁸⁾。p21 的 N 端和 C 端分別擔負起這兩方面的作用。p21 能抑制多種 Cyclin-CDK 活性，推測其突變可能是腫瘤形成的主要原因之一。p21 基因在轉錄上主要受 p53 調節和啟動，而 p53 基因突變在人類腫瘤中卻是常見的，故現認為 p21 基因主要失活機制與 p53 失活有關⁽⁸⁹⁾。p53 是腫瘤抑制因子，在超過一半人類癌症中可發現突變或功能不全。p53 功能可藉由 DNA damage、hypoxia、各種致癌基因及一些細胞毒性刺激而活化。p53 本身也是一種轉錄因子 (transcription factor)，可調節目標基因 (target gene) 表現，進而促進細胞自體凋亡 (apoptosis)、細胞週期停滯 (cell cycle arrest)、細胞衰老 (senescence) 等⁽⁹⁰⁾。

二、Cyclins 與 CDKs

Cyclins 的過度表達可以啟動 CDK 活性，造成細胞週期調節失控，導致腫瘤的形成，因此 Cyclins 也被稱為癌蛋白。目前已發現的 Cyclins 有 12 種，分別命名為 Cyclin A~H。根據細胞週期的時相，分為 G1、S 和 M 期以及作用尚未明確的 Cyclins。

G1 期的 Cyclins 包括 Cyclin C、D、E 等三型，其中後兩型是主要的 Cyclins。Cyclin D 至少有 D1、D2、D3 等三個亞型，之後在 CDK4/CDK6 的作用下，使 pRb 磷酸化，從而使細胞從 G1 期進入 S 期。一些生長因子 (growth factors, GFs) 可誘導它們的表現，一旦去除 GFs，Cyclin D1 的水準會迅速下降，因此，稱它為生長因數感受器 (growth factor sensors)⁽⁹¹⁾。在 G1 期，Cyclin D1 在 G1 的中晚期發揮著重要作用。Cyclin E 在 G1 期的表達晚於 Cyclin D，在 G1/S 交界處達到高峰，進入 S 期後逐漸下降。細胞進入 S 期後，Cyclin E 降解，和它結合的 CDK2 被釋放出來和 Cyclin A 結合^(92, 93)。

S 期 Cyclins 包括 Cyclin A。它是 Cyclins 中最早被發現的，在 G1 晚期於 Cyclin E 之後表達，但直到 S 期與 CDK2 結合後才被啟動。另外，它在 G2 期與 M 期

和 CDC25C (CDK1) 結合，可能與有絲分裂有關，因此，Cyclin A 也被稱為 M 期 Cyclins⁽⁹⁴⁾。

三、CKIs 與細胞週期

Cyclin/CDKs complex 會正向調節細胞週期，然而 CdkIs 會抑制 Cdk 活性，可能是經由 binding CDKs 或 cyclin/CDKs complex，而負向調節細胞週期⁽⁹⁵⁾。近年來，發現 CKIs 可能是藉由組織蛋白 H4 促進基因 (promoter gene- p220NPAT and HiNF-P) 的活性來調控細胞週期。⁽⁸⁷⁾ 一般來說可分為兩種家族：CKIs 主要可分為 2 大家族---CIP/KIP 家族和 INK4 家族 (Inhibitor of CDK4)。CIP/KIP 家族包括 p21、p27、p57；INK4 家族有 p16、p15、p18、p19。CIP/KIP 家族具有抑制 cdk2/cyclin A、cdk2/cyclin E、cdk4/6 cyclin D1/2/3 複合體的活性，造成細胞停滯在 G0/G1 期；INK4 家族則會抑制 cdk4/6 cyclin D1/2/3 複合體的活性，造成細胞停滯在 G1 中期⁽⁹⁶⁾。



第六節、癌細胞轉移 (metastasis)

癌細胞轉移意指癌細胞由原發處 (primary site) 位置，經由淋巴循環、血液循環或藉其他路徑，進入新的組織，並在新組織中增殖、發展成轉移癌 (metastatic cancer) ⁽⁹⁷⁾。因此若能有效抑制癌細胞轉移及癌細胞的擴散，就可阻斷轉移所造成的惡化。癌細胞由原來的發生位置，經過一連串的步驟後，才會在新的組織中增殖形成轉移癌。轉移過程如下：

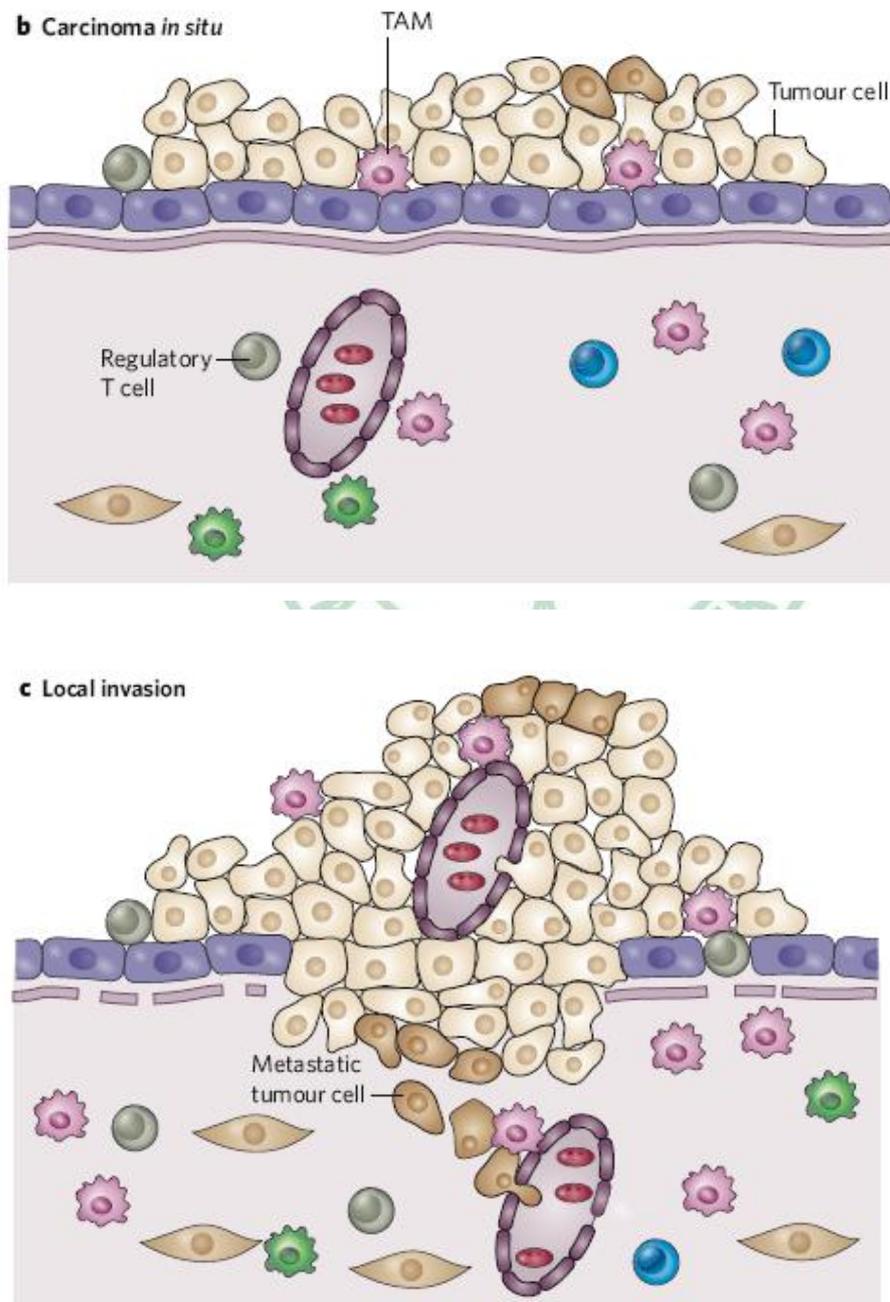


圖2-9 癌細胞轉移過程圖。⁽⁹⁸⁾

癌細胞會以單獨一個或兩個成群脫離原發位置，而游離的癌細胞會破壞細胞外基質和基底膜。



破壞基底膜的癌細胞，會穿透管壁進入血管或淋巴管中。



癌細胞在體內循環流動，到達器官周邊的微血管內和血小板、淋巴球或單核凝集形成血栓塊，以避免免疫系統的攻击。



此栓塊忍受血液的衝擊，緊附於血管內皮細胞。



存活的血栓塊癌細胞可穿透內皮細胞的空隙，並貫穿基底膜到其他組織。



癌細胞遊走於新生組織中繼續增殖，形成第二區的癌細胞。

Matrix metalloproteinase (MMP)，是一群結構含鋅的基質金屬蛋白，能夠降解各種細胞外基質 (Extra cellular Matrix ; ECM) 成分。ECM成分包括膠原蛋白 (collagen)、彈性蛋白 (elastin)、醣蛋白 (proteoglycans) 及其他分子所組成，不同組織器官，各種組成比例就不同。MMP可以促進癌細胞生長、分化、凋亡、轉移、入侵及血管新生。MMPs細胞外活性受到許多因子影響，例如: MMPs內在性抑制因子、轉錄因子的調節、酵素酶原活性的調節.....等。不同的癌細胞會分泌不同的MMP，以便穿透不同組織及血管障壁，促進惡性腫瘤的轉移及侵入⁽⁹⁹⁾。因此本實驗以不同濃度的蜂肽處理人類膀胱癌細胞TSGH-8301觀察是否蜂肽能抑制膀胱癌細胞的轉移能力。

第三章 研究目的

蜂肽 (bee venom) 目前已被廣泛使用在抗風濕、抗發炎、關節炎等臨床治療上，得到不錯的效果。但在對抗癌症這領域，蜂肽抗癌並無確切的機制，目前並無蜂肽誘導人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 走向凋亡的研究。本實驗使用蜂肽混合物，以 *in vitro* 實驗來探討人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 經蜂肽誘導之後，產生內質網壓力、細胞凋亡、抑制轉移與侵襲等相關機制。

第四章 實驗設計

我們以倒立式顯微鏡觀察細胞型態，再以流式細胞儀偵測癌細胞處理藥物之存活率、細胞週期、鈣離子濃度變化、粒線體膜電位、caspase-3, 8, 9 的活性。另外再以彗星試驗、DAPI 染色、DNA 膠體電泳法來觀察細胞 DNA 是否有受到傷害。我們再以西方墨點法來探討細胞內細胞凋亡相關蛋白質之表現量，以及另用共軛焦顯微鏡觀察細胞中蛋白質轉位的現象。最後以轉移與侵襲試驗觀察細胞轉移的能力是否有被藥物所抑制。

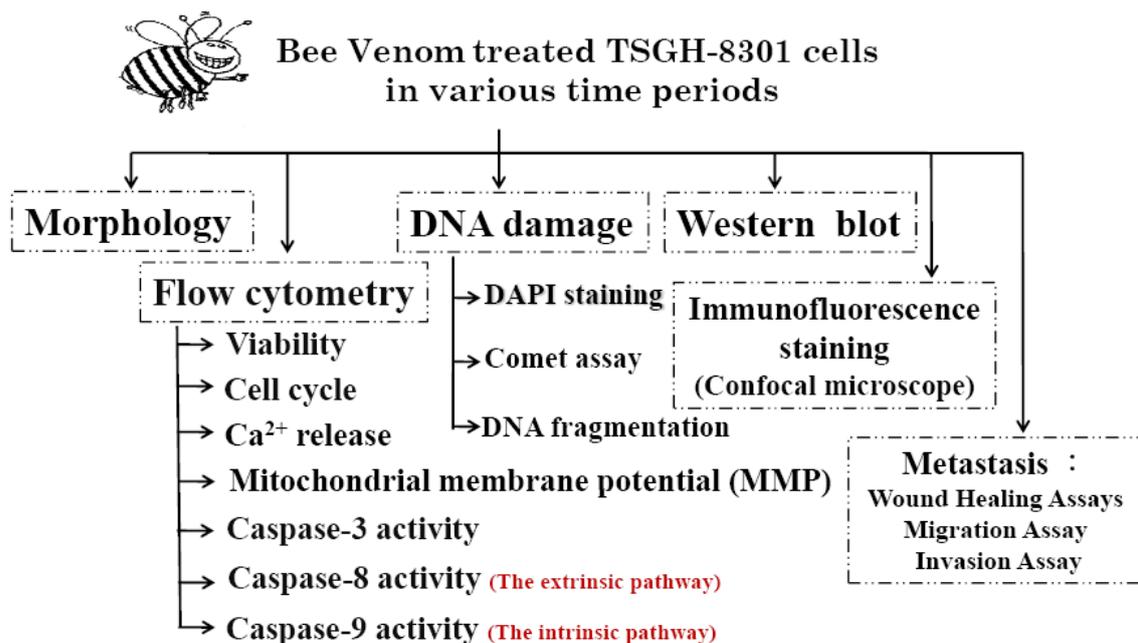


圖 4-1 檢測蜂肽誘導 TSGH-8301 細胞凋亡實驗設計。

第五章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、 細胞株來源

本實驗使用細胞株 TSGH-8301 為人類膀胱癌細胞株 (Human bladder cancer)，購自新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute)。

二、 藥品試劑

流式細胞儀試劑：

1. 3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide (DiOC₆(3))：購自 calbiochem, USA。
2. Propidium iodide (PI)：購自 Sigma Chemical Co, USA。
3. Fluo-3/AM：購自 Molecular probe Invitrogen, USA。
4. PhiPhiLux kit：購自 OncoImmunin, (Gaithersburg, MD, USA)
5. CaspaLux kit：購自 OncoImmunin, (Gaithersburg, MD, USA)

一般試劑：

1. 蜂肽 (bee venom)：購自 Sigma-aldrich. Inc。
2. 2,3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)：購自 Amresco, USA。
3. Acrylamide/bis 40% (Acryl/Bis 29 : 1)：購自 Amresco, USA。
4. Agarose：購自 MD 生化有限公司。
5. Ammonium persulfate (APS)：購自 Amresco, USA。
6. BioMax Flim：購自 Kodak, USA。
7. 顯影劑、定影劑：購自 Kodak, USA。

8. Bovine serum albumin (BSA) : 購自 Merck。
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 購自 Sigma Chemical Co. USA。
10. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit) : 購自 Amresco。
11. Fetal bovine serum (FBS) : 購自 Gibco。
12. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : 購自 Merck。
13. Ethanol : 購自 TEDIA。
14. Formaldehyde : 購自 Sigma。
15. Glycine : 購自 Amresco。
16. L-Glutamine : 購自 Gibco。
17. Low melting agarose (LMA) : 購自 USB。
18. RPMI-1640 medium modified : 購自 Gibco。
19. Methanol : 購自 TEDIA。
20. N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) : 購自 Amresco。
21. Normal melting agarose (NMA) : 購自 USB。
22. Penicillin-Streptomycin (PS) : 購自 Gibco。
23. PhiPhiLux kit : 購自 OncoImmunin (Gaithersburg, MD, USA)。
24. Potassium chloride (KCl) : 購自 Merck。
25. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) : 購自 Merck。
26. Protein assay-Dye reagent concentrate : 購自 Bio-Rad。
27. Protein extraction solution (PRO-PREP) : 購自 iNtRON Biotechnology, Inc.。
28. Protein marker : 購自 Fermentas。
29. RNase A (Ribonuclease A) : 購自 Amresco。
30. Sodium chloride (NaCl) : 購自 Merck。
31. Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 購自 Amresco。
32. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) : 購自 Amresco。

- 33. Triton X-100 : 購自 Sigma ◦
- 34. Trypan blue : 購自 Sigma ◦
- 35. Trypsin-EDTA : 購自 Sigma ◦
- 36. Tween-20 : 購自 Amresco ◦
- 37. Fixer, developer : 購自 Kodak ◦
- 38. 10X TG-SDS buffer : 購自 Amresco ◦

Primary antibody(1st antibody)

- (1) Anti- β actin : 購自 Sigma ◦
- (2) Anti-p-p53 : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦
- (3) Anti-AIF : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦
- (4) Anti-PARP : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦
- (5) Anti-Caspase-3 : 購自 Sigma ◦
- (6) Anti-Caspase-8 : 購自 Sigma ◦
- (7) Anti-Caspase-9 : 購自 Sigma ◦
- (8) Anti-GRP78 : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (9) Anti-GADD153 : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (10) Anti-Caspase 4 : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦
- (11) Anti-XBP 1 : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (12) Anti-PERK : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (13) Anti-ATF6 α : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (14) Anti-ATF6 β : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (15) Anti-IRE1 α : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (16) Anti-HIF1 α : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc ◦
- (17) Anti-Ras : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦
- (18) Anti-Fas : 購自 BD biosciences Pharmingen ◦

- (19) Anti-FasL : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (20) Anti-Bid : 購自 calbiochem.USA 。
- (21) Anti-Bax : 購自 calbiochem.USA 。
- (22) Anti-Cyclin D : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (23) Anti-Cyclin E : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (24) Anti-Cdk6 : 購自 sigma 。
- (25) Anti-Cdk2 : 購自 sigma 。
- (26) Anti-XIAP : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (27) Anti-Chk2 : 購自 Oncogene 。
- (28) Anti-TRAIL : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc 。
- (29) Anti-Endo G : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc 。
- (30) Anti-Bcl-X : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (31) Anti-p21 : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (32) Anti-p65 : 購自 BD biosciences Pharmingen 。
- (33) Anti-JNK : 購自 Santa Cruz biotechnology. Inc

Secondary antibody(2^o antibody)

- (1)Goat anti-mouse IgG (HRP)horserasish peroxidase conjugated antibody :
購自 Chemicon 。
- (2) Goat anti-sheep IgG (HRP)horserasish peroxidase conjugated antibody :
購自 Chemicon 。
- (3) Goat anti-rabbit IgG (HRP)horserasish peroxidase conjugated antibody :
購自 Chemicon 。

三、儀器設備與器材

1. 無菌操作台、細胞培養皿、冷凍管、細胞培養箱、恆溫離心機、血球計數板、倒立式相位差顯微鏡、Dispenser、1.5/15/50 ml 離心管、Pipetment。
2. 去離子水製造機、電源供應器、酸鹼值測定計、PVDF 膜、震盪器、SDS-PAGE 電泳槽套組、Transfer Cell Blot Kit、加熱板。
3. 流式細胞儀、高速離心機、酵素免疫分析儀、單細胞電泳槽。

第二節、實驗方法

一、Bee venom (BV) 藥物配製：

BV 由 Sigma-aldrich. Inc 購得，一瓶為粉狀混合物藥物，重 100 mg。本實驗加入 10 ml 1%DMSO 配成 10 mg/ml 為 stock solution。再分別加入 1%DMSO 配製成不同濃度，最後將蜂肽加入 Medium 中稀釋一百倍的濃度為 2.5、5、7.5、10、20、30 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 3-2-1 蜂肽濃度配製表

BV 濃度 (mg/ml)	0.25	0.5	0.75	1	2	3
10 mg/ml	5	10	15	20	40	60
1%DMSO	195	190	185	180	160	140
Final solution ($\mu\text{g/ml}$)	2.5	5	7.5	10	20	30

二、人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 細胞培養

TSGH-8301 所使用的培養基為 RPMI-1640 medium modified，額外添加胎牛血清 (FBS)、抗生素 (Penicillin-Streptomycin, PS) 與 L-Glutamine，使細胞培養基最終含有 10 %FBS、1 %PS 與 2 ml L-Glutamine。細胞培養

於 5% CO₂ 及 37°C 環境下的無菌細胞培養箱中，且約 2 至 3 天更換一次培養基，當細胞長至八分滿時進行繼代培養或分盤供實驗用。

繼代或分盤時，先以磷酸緩衝溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 清洗細胞，再以 0.05 mg/ml Trypsin-EDTA 處理 3 至五分鐘，接著加入培養基減緩 Trypsin-EDTA 的作用，並轉至離心管中離心 1500 rpm，五分鐘。離心後，加入培養基稀釋並回種於新的培養瓶或培養品中進行繼代；分盤則以少量培養基稀釋，利用血球計數板與 Trypan blue 計算細胞數 (死細胞會被 Trypan blue 染上，在計數板上呈現藍色、活細胞則否)、之後接種需要的細胞數至培養品或培養盤內以備實驗用。

三、 TSGH-8301 cells 細胞冷凍保存與活化

細胞經大量培養後需給予保存，以維持最正常的狀態，避免影響日後實驗結果。因此，細胞經數次繼代後，以 Trypsin 收下，經血球計數板計算細胞數，將細胞數調為 2.5×10^5 cell/mL，再以含有 7 % DMSO (在此做為抗凍劑) 支 FBS 混勻，並分裝置冷凍小管中。分別於 4°C 存放 30 分鐘，-20°C 存放 60 分鐘，最後於 -80°C 存放隔夜，翌日再轉放於液態氮桶中以備日後使用。

活化細胞時，以快速解凍為最佳，如此可避免冰晶生成影響細胞存活。故自液態氮桶取出細胞後，以 37°C 恆溫水浴槽快速回溫，待其溶解後以培養基稀釋凍液中 DMSO 濃度，並離心除去抗凍劑。移去上清液後加入新鮮的培養基，並接種於培養瓶中進行活化。

四、細胞存活率 (Viability)分析⁽¹⁰⁰⁾

實驗原理：

利用 Propidium Iodide (PI) 染劑檢測癌細胞經過所要實驗的藥物處理後，癌細胞的存活率的變化。PI 染劑是一種核酸染劑，會與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，經 488 nm 雷射光激發後，產生散射光波長的螢光，由流式細胞儀的偵測器接收，最後以 Cell Quest[®] 軟體分析。PI 染劑會藉由細胞膜構造的改變、細胞膜通透性的改變、細胞膜結構的破損進而近入細胞並與 DNA 雙股螺旋上的氫鍵結合，使其細胞具有較高的螢光強度。反之若細胞膜具有完整的結構及正常的通透性，PI 則無法順利通過細胞膜與 DNA 結合，所以此細胞則會產生較弱的螢光。藉此細胞特性及染色原理，本實驗可區分經 PI 染色後的細胞，螢光強度較高者為死細胞，螢光強度較弱者為活細胞。

實驗方法與步驟：

將 TSGH-8301 細胞種植於 12-well plate 中，細胞數約 $2-5 \times 10^5$ cell/ml/well，再經過 24 小時的靜置培養，等細胞貼盤後，加入 20 μ l 不同濃度的 BV (2.5 μ g、5 μ g、7.5 μ g、10 μ g、20 μ g/ml)，分別持續培養 24、48、72 小時。經藥物處理過後的細胞依照所需檢測的時間點加以收取。首先，將培養皿中的上清液吸取至 15 ml 離心管中，以 Phosphate Buffer Saline (PBS) 清洗培養皿中的細胞，清洗後的液體也放置於離心管中。第二步，加入 0.1% Trypsin 於培養皿中，其量覆蓋過培養皿表面即可，靜置三分鐘後輕拍培養皿使其貼附的細胞懸浮，加入 3 ml PBS 中和 Trypsin 作用，再將其細胞懸浮液吸取至前步驟的離心管，以 1500 rpm 離心五分鐘，再次去除上清液。第三部：在避光的環境下加入 PI 染劑 1 ml (染劑加入的量可依照細胞數多寡做調整)，使其均勻混和後，轉至 FACS 管中，最後以流式細胞儀進行分析，固定其細胞數及流速，觀察並記錄細胞存活之百分比 (%)。

PI 染劑的配製

先配製出濃度為 2 mg PI/100 ml PBS 作為 PI stock，於要進行實驗時再利用 PBS 將 PI stock 稀釋五倍，最後是以 0.4 mg PI/100 ml PBS 作為使用濃度。

Phosphate Buffer Saline (PBS)的配製

1×PBS(一倍的磷酸鹽緩衝鹽溶液)其成分組成為

(1) NaCl : 8.0 g (2) KCl : 0.2 g

(3) Na₂HPO₄ : 1.44 g (4) KH₂PO₄ : 0.24 g

(5)最後以 DDW (distilled, deionized water ; 去離子水)將定量至 1000 ml。

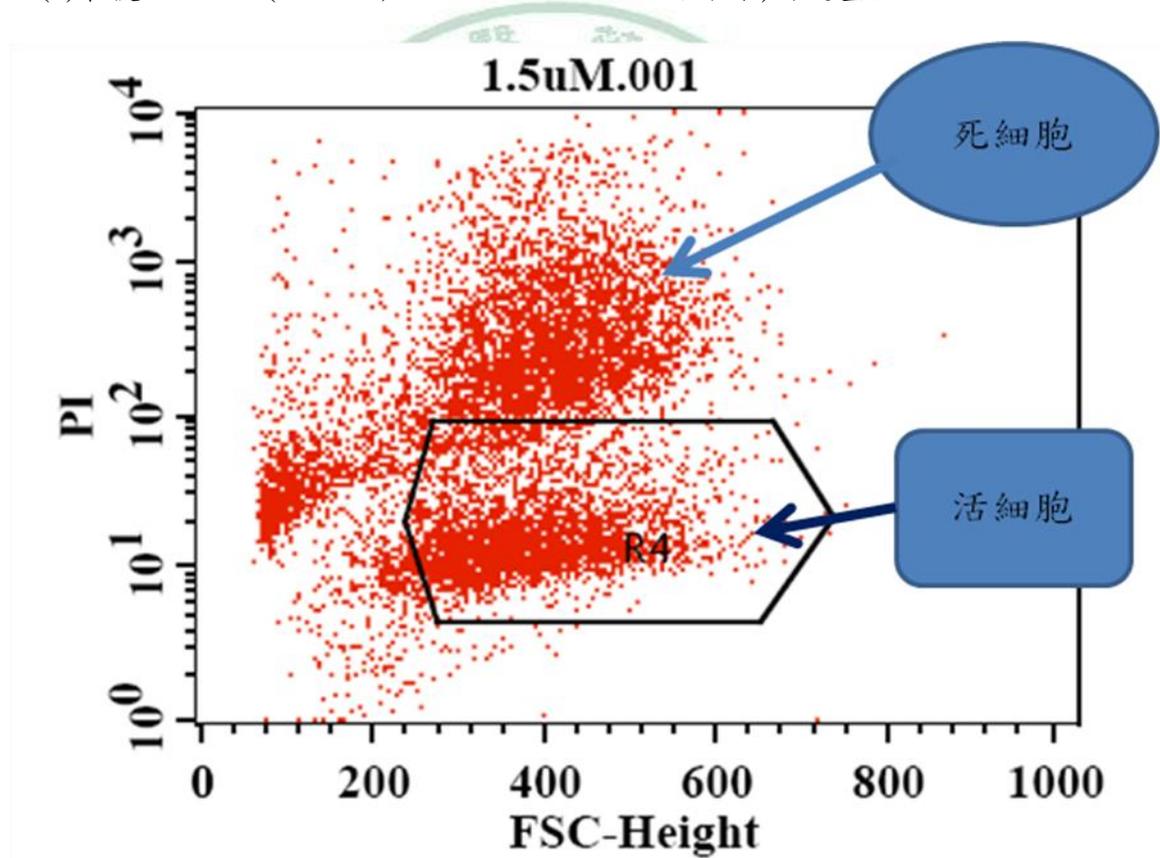


圖 5-1 流式細胞儀存活率分析圖。

五、細胞週期 (Cell cycle)之分析⁽¹⁰¹⁾

(1)實驗原理：

本實驗利用 PI 染劑標定 DNA，當細胞膜完整時 PI 是無法與細胞內核酸做鍵結，故利用酒精固定 (Fixed)細胞與增加膜的通透性，利用 PI 與細胞內核酸鍵結一起後，於流式細胞儀進行分析，經由 DNA 之狀態進行細胞週期之分析。

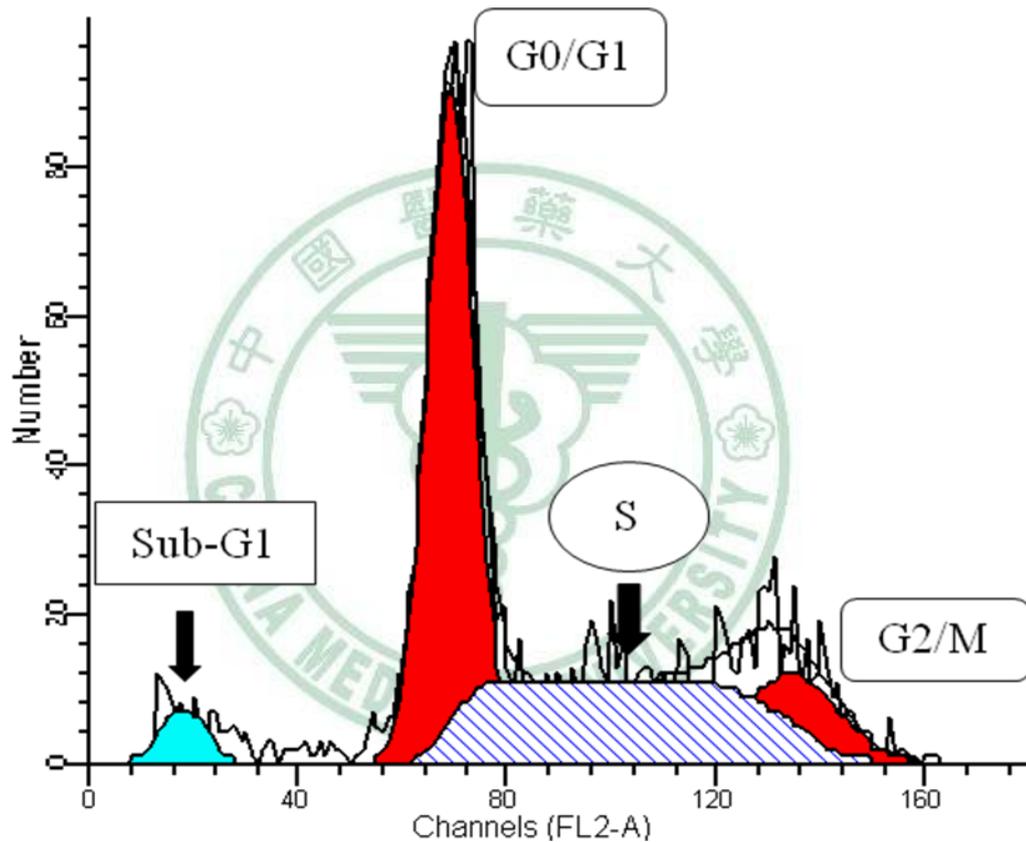


圖 5-2 流式細胞儀細胞週期分析圖。

表 3-5-1 Cell Cycle PI 染劑配製

(2)Cell Cycle PI 染劑：配法如下

20 mg/100 ml PBS CAT PI stock	1 ml
5 % Triton X-100	10 ml
RNase(10 mg/ml in PBS)	2 ml
1 X PBS	加至 50 ml

(3)步驟：將人類膀胱癌細胞 TSGH-8301 細胞，接種於 12-well 培養盤中，其每 well 所含細胞數為 2×10^5 cell/ml/well，細胞培養於 37°C、5 % CO₂ 培養箱中，再分別給予不同濃度之蜂肽 (2.5、5、7.5、10、20 μg/ml)，及不同的培養時間為 24、48、72 小時後將細胞收集於離心管中，用 1 X PBS 清洗一次，離心 1500 rpm 五分鐘，倒掉上清液、再用 1 X PBS 清洗兩次，離心 1500 rpm 五分鐘，倒掉上清液後，將細胞打散，於震盪器上以 shake 3 速度震盪，緩緩加入 4°C 的 70% 酒精，已進行細胞固定，細胞固定後至於 -20°C 隔夜。隔天將細胞取出，離心 1500 rpm 五分鐘，以 1 X PBS 清洗，再離心 1500 rpm 五分鐘，倒掉上清液後加入 500 μl PI solution，避光反應 30 分鐘後，再以流式細胞儀來進行偵測、分析，每秒的細胞數目不超過 200 顆，每個數據收集 10000 顆細胞，且以低流速來進行分析，數據以 Modfit LT[®] 軟體來進行分析，紀錄 G0/G1、S、G2/M phase 及 sub-G1 比例。

六、 Caspase-3, -8, -9 活性分析⁽¹⁰²⁾

(1) 實驗原理：

利用 Caspase-3 substrate (PhiPhiLux-G₁D₂)、Caspase-8 substrate (CaspaLux-L₁D₂)、caspase-9 substrate (CaspaLux-M₁D₂)來監測凋亡細胞相關蛋白 caspase-3, -8, -9 之產生，PhiPhiLux kit 基質是種含有螢光物質之胺基酸序列，而活化之 caspase-3, -8, -9 可以裂解胺基酸序列之特定位置，史的含有螢光物質釋放出來，產生綠色螢光，再經由流式細胞儀 (Flow Cytometry) FL-1 detector 偵測後，CellQuest® 分析、統計後可得知若螢光產量越多則產生 caspase-3, -8, -9 活性亦越多。

(2) 實驗步驟：

將人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 種植於 12-well 中，細胞依照 2×10^5 cell/well 於培養皿中之後加入蜂肽 10 μ g/ml，經過 24、48、72 小時處理後，收細胞，取 10 μ M substrate (for caspase-3, -8, -9)，每管加入 25 μ l，再至於 37°C 水浴避光培養 1 小時，後加入 1 ml PBS 洗一次，離心 5 min，倒掉上清液，每管加入 500 μ l Flow Cytometer Buffer，再 transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品 caspase-3, -8, -9 活性分析 (綠色 peak 往右為 caspase-3, -8, -9 產生)。

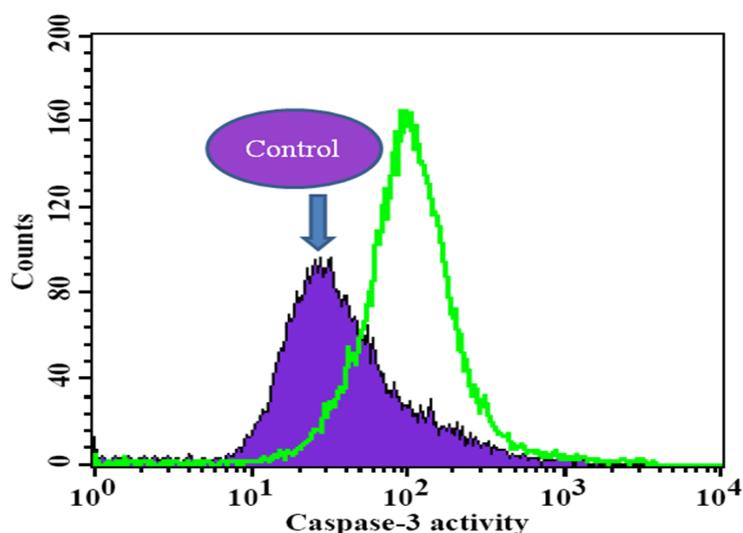


圖 5-3 流式細胞儀 Caspase-3 分析圖。

七、人類膀胱癌細胞之細胞核質濃縮現象觀察

DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole) 螢光染色⁽¹⁰³⁾

1. 實驗原理：

DAPI 是一種核酸螢光染劑，其會專一性的結合再 DNA minor groove 上 AT 區，此染劑利用紫外光波長的光線激發，當 DAPI 與雙股 DNA 結合時，最大吸收波長為 358 nm，最大發射波長為 461 nm；當細胞產生凋亡時，會出現染色質凝結 (chromosomes condensation)、DNA 斷裂(DNA fragmentation)等情形，若細胞凋亡越嚴重，則 DNA 斷裂越多；相對的 minor groove 上的裸露出來的 AT 區也越來越多，進而使的染上的 DAPI 染劑越多，其在螢光顯微鏡下觀察，可發現凋亡細胞會發出比正常細胞高達 20 倍的螢光強度。

2. 實驗步驟：

將人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301)分盤並重於 6-well plate 當中，每 well 種 2×10^6 cell/well，再分別給予不同濃度之蜂肽 (2.5、5、7.5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)與對照組，培養 24、48 小時後，將上清液抽掉，用 1 X PBS 清洗兩次，再加入 3 % 福馬林/in PBS (蓋過細胞及可)固定 10-15 分鐘，抽掉福馬林，再以 PBS 清洗數次，再加入 0.1 % Triton X-100/PBS (蓋過細胞即可)15 分鐘，之後再用 PBS 洗兩次，最後加入已裝 DAPI 染劑溶液 (1 $\mu\text{l/ml}$)300 μl ，至於 37°C 培養箱避光反應 30 分鐘後，用 PBS 洗三次後，於螢光顯微鏡 F200 X 照相。DAPI 結構式：

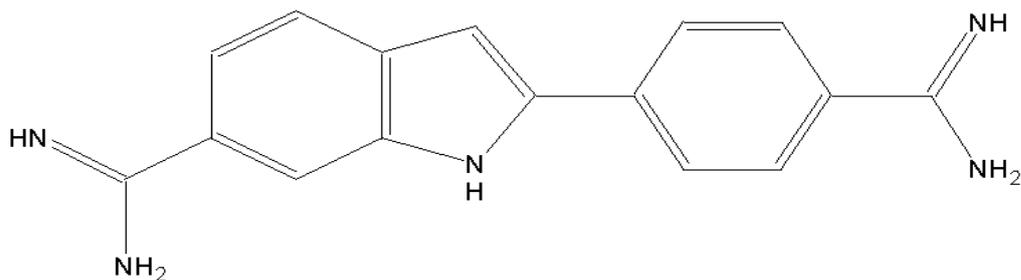


圖 5-4 DAPI 結構圖。

八、DNA 彗星拖尾試驗(Comet assay)⁽¹⁰⁴⁾

1. 實驗原理：

單細胞電泳分析 (Single cell gel electrophoresis assay)即是所謂的彗星試驗，可用來分析及定量 DNA damage 程度，是一個簡單、快速以及敏感度高的技術。利用電泳的原理將斷裂成大小不同片段的 DNA 分開，之後加以染色，DNA 受損越嚴重，斷裂也就越多，拖尾也就越明顯，其外觀形似彗星狀而命名之，由此可藉由拖尾的長短，觀察 DNA 的損傷程度。

2. 試劑配製：

A. Lysis buffer (需新鮮配製，pH=8~10；配方如下)：其可破壞細胞膜的結構，以方便之後的 DNA 電泳。

表 3-8-1 Lysis buffer 之配製

組成	體積(ml)
5 M NaCl	100 ml
1 M Tris-HCl	2 ml
0.5 M EDTA	40 ml
Triton X-100	2 ml
DDW	56 ml
Total	200 ml

B. Alkaline buffer (pH=13)：其可將 DNA 雙股螺旋解開成單股 DNA，當跑電泳時，即可區分出不同片段大小的 DNA。

表 3-8-2 Alkaline buffer 之配製

組成	重量 (g)
NaOH	12 g
EDTA	0.3724 g
DDW	

C. Tris buffer (0.4 M，以 HCl 調整 pH=7.5)：使 sample 恢復中性。

表 3-8-3 Tris buffer 之配製

組成	重量 (g)
Tris	48.456 g
DDW	1000 ml

3. 實驗步驟：

將懸浮人類膀胱癌細胞分盤並種於 12-well 中，每 well 種 2×10^5 cell/well/2 ml，之後加入不同濃度的蜂肽 (2.5、5、7.5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)，另外還需準備 positive control (H_2O_2) 培養 24、48 小時後，將細胞吸至 15 ml 離心管，以 1000 rpm 離心五分鐘，去上清液，加入 1 X PBS 約 1 ml，將細胞 transfer 到 1.5 ml eppendorf，經高速離心後去上清液，打散 pellet 加入 1 X PBS 100 μl (體積依細胞量調整);此時，將上、下層膠以微波溶解後放於 55°C 水域鍋中備用，之後準備磨沙載玻片並在載玻片上以鉛筆標上組別號碼，至 70 μl 的下層膠 {0.5 % NMA+0.5 % LMA} 於載玻片上，將蓋玻片以 45° 角蓋上防止氣泡產生，代膠凝固後拿下蓋玻片，之後取 10 μl 細胞液與 60 μl 的上層膠 (0.5 % LMA) 混合均勻後，加在下層膠上，再將蓋玻片以 45° 角蓋上並防止氣泡產生，帶凝固後拿下蓋玻片，之後配製 lysis buffer。將做好的膠至於 lysis buffer 中反應一

小時，後將膠移至 alkaline buffer 中反應 20 分鐘，將電泳槽置於冰上，以 alkaline buffer 為電泳液跑 30 分鐘 (25 V ; 300 mA)。電泳後，將膠移至 0.4 M Tris buffer 作用 5 分鐘，使其 pH 值回到中性，再將膠置於 methanol 脫水五分鐘，最後加入 40 μ l PI (2.5 μ g/ml) 以螢光顯微鏡觀察，評估細胞拖尾現象，判定細胞受損的情況。

九、粒線體膜電位 (Mitochondria membrane potential; $\Delta\Psi_m$)⁽¹⁰⁵⁾

(1) 實驗原理：細胞膜電位探針，DiOC₆ (3)(3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) 是一種可穿透細胞膜，可專一性結合並累積在細胞粒線體中，其在細胞內外的分布可反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示細胞膜電位改變的情形，可發射出綠色螢光 (green-fluorescent) 之陽離子 (cationic dye) 親脂性染劑；在不需要固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒線體膜電位的改變。粒線體膜功能不良 (mitochondrial dysfunction) 通常伴隨早期細胞凋亡的發生，而細胞粒線體膜電位的改變也因此當作早期凋亡偵測上的指標。

(2) MMP ($\Delta\Psi_m$) 試劑：1 μ l DiOC₆ (3) stock sol'n + 50 μ l PBS diluted ; DiOC₆

(3) stock sol'n : 20 mM ; working sol'n : 1 mM。(3) 實驗步驟：將人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 種植於 12-well 中，每 well 種 2×10^5 cell/well/2 ml，再加入 1 mg/ml 的蜂肽，以 20 μ l/2 ml medium/well 到 12-well plate 當中(最終濃度為 10 μ g/ml)，加藥時間後經不同時間培養(0、1、3、6、12、24 小時)，即可收取不同時間點的細胞。首先將細胞懸浮液吸取到離心管中，加入 1 X PBS 清洗 plate 上的細胞一次後，以 1500 rpm 離心五分鐘，倒掉上清液後，再加入 3 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心五分鐘，去除上清液，配製 MMP 染劑 DiOC₆ (3)(1 μ l DiOC₆ (3) working sol'n/500 μ l PBS)，每

管 sample 加入 500 μl 配製後的 DiOC₆ (3) 染劑；此外，須有一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μl PBS，之後將 sample 置於 37°C 水浴避光反應 30 分鐘後，transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每管 sample 收集 10000 顆細胞，之後以 CellQuest[®] 分析。將 blank 調在 $10^0\sim 10^1$ 之間，control 調在 $10^1\sim 10^2$ 之間，M1 gated 約 50 %，sample 上機後，分析螢光強度 (DiOC₆ 螢光強度可以由 FL1-H detector 來偵測)，最後以 M1 的數值即是加藥後粒線體膜電位下降產生 (綠色 peak 往左則是 MMP 有下降的結果)。

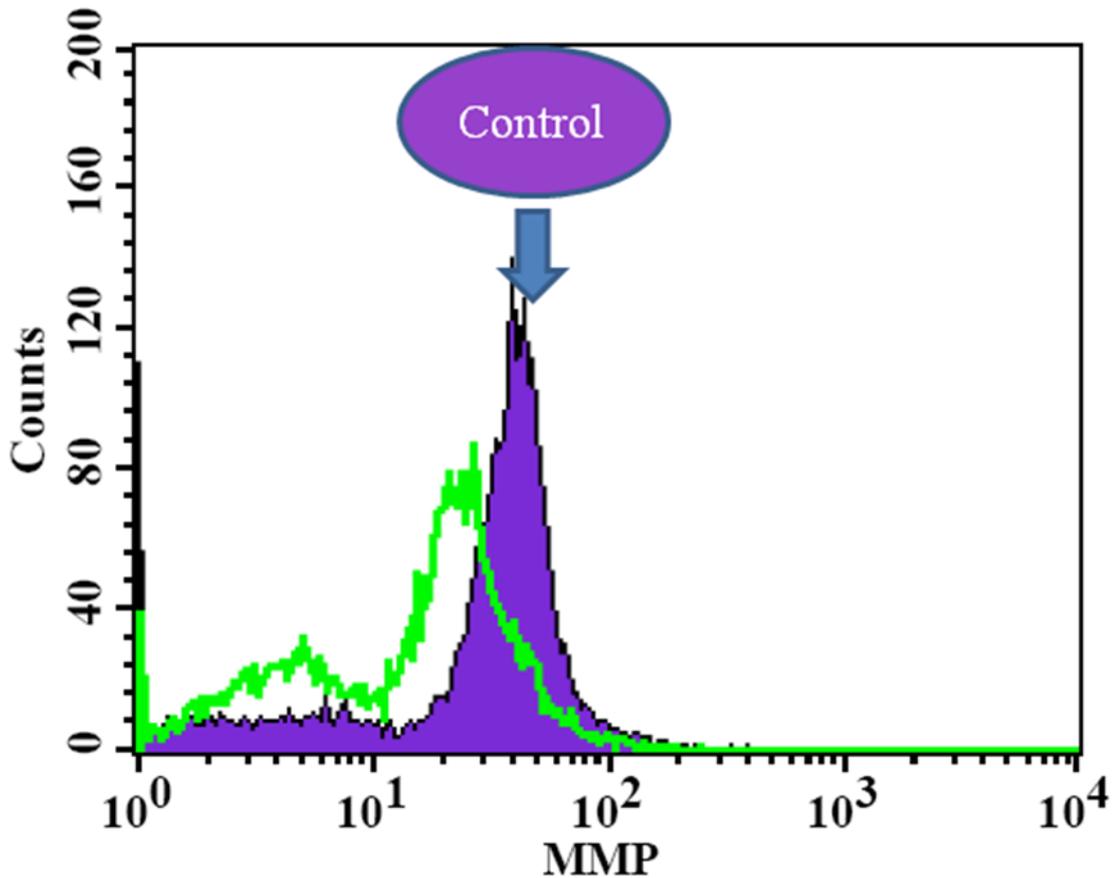


圖 5-5 流式細胞儀偵測粒線體膜電位分析圖。

十、 檢測細胞內鈣離子(Ca^{2+})釋出的變化⁽¹⁰⁶⁾

(1) 實驗原理：細胞內鈣離子可做為細胞信號傳遞的分子，是細胞激活過程中重要的功能因子，細胞內鈣離子濃度大約在 100 nM 左右，最近有文獻指出若是內質網或高基氏體釋出鈣離子使得胞內鈣離子濃度大於 1 μM 就有可能使細胞走向細胞凋亡途徑^(107, 108)。

(2) 鈣離子染劑：Fluo-3/AM

(3) 實驗步驟：首先將細胞懸浮液吸取到離心管中，加入 1 X PBS 清洗 plate 上的細胞一次後，以 1500 rpm 離心五分鐘，倒掉上清液後，再加入 3 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心五分鐘，去除上清液，配製鈣離子染劑 Fluo-3/AM (1 μl Fluo-3 AM working sol'n/500 μl PBS)，每管 sample 加入 500 μl 配製後的 Fluo-3/AM 染劑；此外，須有一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μl PBS，之後將 sample 置於 37°C 水浴避光反應 40 分鐘後，transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析，每管 sample 收集 10000 顆細胞，之後以 CellQuest[®] 分析。將 blank 調在 10^0 ~ 10^1 之間，control 調在 10^1 ~ 10^2 之間，M1 gated 約 50 %，sample 上機後，分析鈣離子釋出程度（綠色 peak 往右表是細胞內鈣離子濃度增加）。

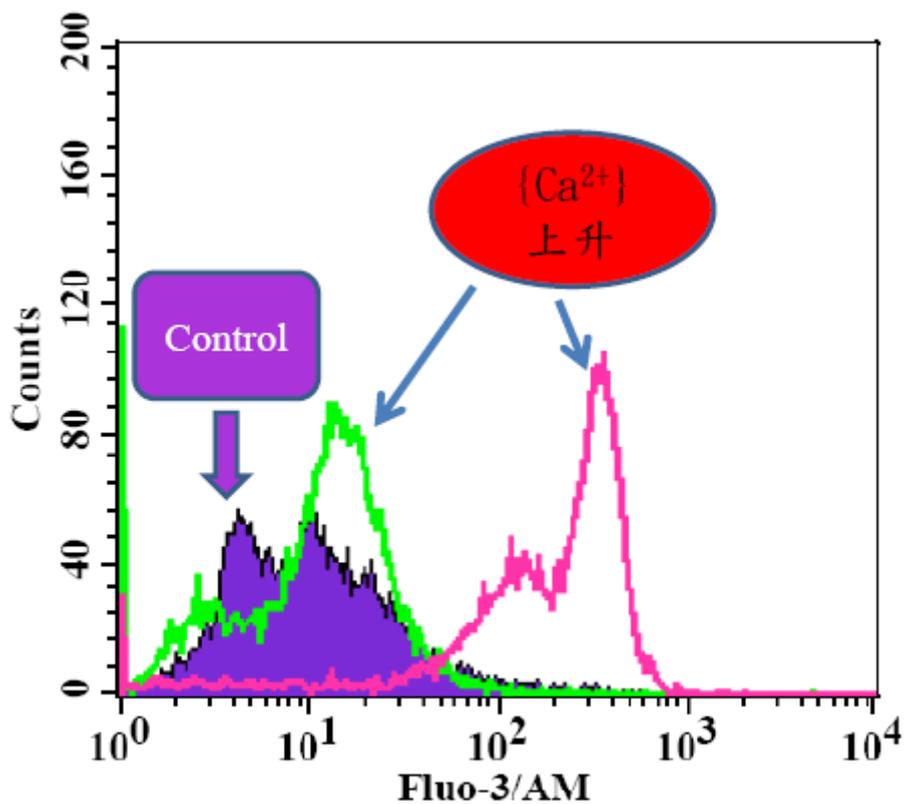


圖 5-6 流式細胞儀偵測粒鈣離子濃度分析圖。

十一、鈣離子螯合劑 (BAPTA) 的檢測⁽¹⁰⁹⁾

BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid), 是一種鈣離子螯合劑, 以類似 EDTA 的螯合方式抓住細胞內鈣離子。本實驗預處理 BAPTA 三小時之後, 才開始處理蜂肽, 目的是探討蜂肽是否經由鈣離子相關路徑誘導 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡。

十二、西方墨點法 (Western Blotting)⁽¹¹⁰⁾

1. 細胞蛋白質之萃取 (protein extraction)

(1). 細胞總蛋白萃取試劑：Protein Extraction Solution (lysis buffer)：

PRO-PREP for Cell/Tissue

(2). 實驗步驟：

將人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 以 2×10^6 cell/dish 的細胞量種植於 10 cm² dish 中，每 dish 的培養液總量為 10 ml，後加入 100 μ l 之所需濃度之蜂肽 (10 μ g/ml) 至每個 dish 中，經不同時間的藥物處理後 (0、6、12、24、48、72 小時)，收取細胞，將細胞用 PBS 清洗，離心後，加入 1 ml PBS，將其 transfer 至 1.5 ml 微量離心管中，離心後將 PBS 吸乾，再加入 400 μ l lysis buffer (依照細胞量多寡決定加入的量，一般每 2.5×10^6 的細胞數會加 200 μ l lysis buffer)，將細胞震盪混合均勻後，置於 -20°C overnight，之後離心 (14000 rpm，20 分鐘) 取其上清液，亦即 lysis buffer 與細胞蛋白混和之液體，之後進行蛋白質的定量動作。

(3). 蛋白質濃度測定：

2. 蛋白質標準品檢量線製做：

以 Bradford 定量法，使用胎牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin; BSA) 當作蛋白質標準品 (下表)，配製不同濃度之蛋白質標準品後 (BSA 在蛋白質定量曲線大多在 0.2~0.9 mg/ml 之間，IgG 的線性範圍則在 0.2~1.5 mg/ml)，利用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 在 O.D.595 nm 條件下測量其吸光值做檢量線 (standard curve) 分析，求出趨勢線方程式與 R² 值。步驟：先取 Bradford 染劑 (Bio-rad) 2 ml 加 8 ml DDW (5 X 稀釋) 混合均勻備用，取 20 μ l 配製的蛋白標準品 (BSA) 加 1000 μ l Bradford 染劑混合均勻，置於 96-well plate 中，每 well 加入 200 μ l (三重複)，靜置五分鐘後以 O.D.595 nm 測量吸光值，求其平均值，以 O.D. value (Y) 對蛋白濃度 mg/ml (X)，求出

趨勢線方程式 $y = ax + b$ ， R^2 值要趨近於 0.99。

表 3-11-1 BSA 之配製

BSA 濃度 (mg/ml)	1 mg/ml BSA (ml)	DDW (μ l)
1.0	1000	0
0.8	800	200
0.6	600	400
0.4	400	600
0.2	200	800
0	0	1000

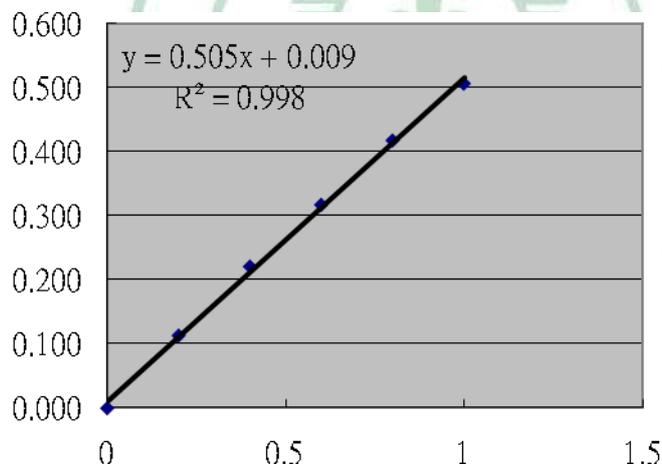


圖 5-7 BSA 標準曲線分析圖。

3. 樣品蛋白質定量：

取 20 μ l sample protein 與 1000 μ l 的 Bradford dye (以 DDW 將原液五倍稀釋) 混合，反應五分鐘後，同蛋白質標準品一起測定吸光值，所得之吸光值平均，帶入 y 值 ($y = ax + b$)，求出該 sample 的蛋白質濃度 $x = (y - b) / a$ (μ g/ml)。

(A) SDS-PAGE 分析

1. 試劑材料：(表 3-11-2 到表 3-11-8)
2. 膠片製作與電泳步驟:將配製的下層膠 Separation gel 注入鑄膠台中，再以 isopropanol 去除氣泡並壓平下膠，靜置約 30 分鐘後，可觀察下層膠管中的剩餘膠體是否凝固，待凝固後，將 isopropanol 倒掉，後注入上層膠並插上 comb，避免氣泡產生，待上層膠凝固後，將鑄好膠體放置於電泳槽中，加入電泳緩衝液(1 X TG-SDS buffer)，接著將萃取出蛋白依定量後的體積與 5 X protein loading dye 混合，並以 100°C 加熱 5~10 分鐘使蛋白變性，通以電壓 80 伏特，帶樣品通過 stacking gel 後，電壓調為 110 伏特，進行電泳，當 SDS-PAGE 染劑跑出 SDS-PAGE 後或可視其需要，即可關掉電源。
3. 轉漬步驟：先將 PVDF membrane，以 methanol 濕潤約五分鐘，再浸入轉印緩衝液 (transfer buffer) 中，接著將濾紙先浸泡在 transfer buffer 中，將轉漬夾打開後，黑色面朝下，將海綿墊片先以 transfer buffer 潤濕並鋪在黑夾上，再將 3M 濾紙鋪上，接下來剪裁下層膠 (separation gel) 中所要轉漬的區域後，將 SDS-PAGE gel 小心的鋪於 3M 濾紙上，可在濾紙上加入多量的 transfer buffer，再鋪上 gel 時勿產生任何氣泡，再依序放上 PVDF membrane，同樣避免氣泡產生，及 3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片，即可把整個轉漬夾裝好，形成似三明治夾層狀之構造。置入已裝有 transfer buffer 的電泳槽中將黑夾朝負極，白夾朝正極，電泳槽外圍放置足夠冰塊，使整個系統維持低溫狀態。以 400 mA、2 小時的條件進行蛋白質轉漬步驟。轉印完成後取出轉印膜裁去多餘部分，轉印膜後以 0.1 % PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。緊接將轉印膜以 2% FBS (溶於 0.1 % PBST 中)進行 Blocking 步驟，以室溫 1 小時為條件進行。取出 PVDF 膜後 0.1 % PBST 清洗 10 分鐘共 3 次。倒掉清洗液，加入 8 ml 的一級抗體 (溶於新

鮮配製之 Blocking solution 中，稀釋倍數依不同抗體有所不同)，4°C 隔夜進行搖盪。隔天取出，回收一級抗體，以 0.1% tween-20/1X PBS 清洗轉印膜 10 分鐘共三次。加入 8 ml 稀釋 5000-10000 倍的 anti-IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody 二級抗體 (2 % FBS 的 0.1 % PBST 中)，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉印膜後以 0.1% PBST 洗清 10 分鐘共三次。

4. 暗房壓片步驟：將 PVDF 膜浸泡於 ECL 試劑之混合液 (每瓶各取 1.5 ml 等比例混合)中 1 分鐘反應。以兩張投影片黏貼固定於壓片匣 (cassette) 內，轉印膜正面朝上放置於壓片匣的兩張投影片中間，以 Hyperfilm 軟片置於上層投影片上，對準轉印膜進行壓片。感光時間依轉印膜上螢光亮度決定時間長短，約 5 秒至 20 分鐘不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟 (時間依實際觀察決定)，再以清水沖洗 30 秒後放入定影劑中直至底片呈透明狀後，再以清水沖洗乾淨。

表 3-11-2 SDS-PAGE 下層膠 (Separation gel)之配製及組成。

組成	10% Separation gel(四片量)	12% Separation gel(四片量)
DDW	9.6 ml	8.6 ml
40% Acryamide/Bis(29:1)	5 ml	6 ml
Running buffer	5 ml	5 ml
10% SDS	0.2 ml	0.2 ml
10% APS	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	10 µl	8 µl

表 3-11-3 SDS-PAGE 上層膠 (Stacking gel)之配製及組成。

組成	Stacking gel(四片量)
DDW	4.06 ml
40% Acryamide/Bis(29 : 1)	1.02 ml
Running buffer	1.66 ml
10% SDS	66 μ l
10% APS	33.4 μ l
TEMED	8 μ l

表 3-11-4 Running buffer (1.5M Tris-HCl, pH=8.8)

組成	重量 (g)
Tris	36.3 g
DDW	150 ml
HCl	調整至 pH=8.8
加 DDW 到總體積 200 ml	

表 3-11-5 Stacking buffer (0.5 M Tris-HCl, pH=6.8)

組成	重量 (g)
Tris	3 g
DDW	40 ml
HCl	調整至 pH=6.8
加 DDW 到總體積 50 ml	

表 3-11-6 電泳緩衝液 (Running buffer)之組成。

組成	重量
10X TG-SDS buffer(25 mM Tris 、 192 mM glycine 、0.1%SDS)	200 ml
加 DDW 到總體積 2000 ml	

表 3-11-7 轉印緩衝液 (Transfer buffer)之組成。

組成	重量
Tris	4.5 g
Glycine	21.6 g
Methanol	300 ml
加 DDW 到總體積 1500 ml	

表 3-11-8 PBS-tween 20 (PBST)之組成。

組成	重量
Tween-20	1 ml
PBS	1000 ml

十三、免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining)⁽¹¹⁰⁾

1.原理：

利用抗體特異性，並以一級抗體結合所需偵測之蛋白質，在藉二級抗體連接 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光的方式，且使用螢光染劑 (PI、DAPI、Rhodamine 123、Mito tracker Red CMXRos)，染細胞內胞器，如：細胞核，粒線體，再來利用共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 觀察蛋白質表現量的差異以及是否有轉位入細胞核的現象發生，進行控制組與實驗組的比較。

2.實驗步驟：

- (1) 將人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301) 種植於 10 cm² dish 中，使細胞數約為 2×10^6 cell/dish。
- (2) 接著加入 10 µg/ml 蜂肽處理人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301)，培養 24 小時後收細胞，將細胞置於已裝 methanol 的染缸裏，主要是用來固定細胞。
- (3) 然後再用 0.1% Triton-X 100 將細胞打洞後，以 PBS 清洗，加入一級抗體。(overnight)
- (4) PBS 清洗，後加入二級抗體 (避光)
- (5) PBS 清洗，依需要使用不同的螢光染劑
- (6) PBS 清洗，各五分鐘，以封片膠將其封片，進行共軛焦顯微鏡 (Confocal microscope) 觀察

十四、Wound Healing Assays (細胞傷口癒合試驗)、Migration Assay (轉移試驗)、Invasion Assay (侵襲試驗)⁽¹¹¹⁾

1. Wound Healing Assays：將 10^4 的 TSGH-8301 cells 種入 6-well 盤中，待其長滿盤面時，在細胞中以尺規畫出一條規格一致的區域線，再加入不同濃度蜂肽，以倒立式顯微鏡觀察蜂肽是否有抑制細胞爬行的能力。
2. Migration Assay：將表面有 8 μm 大小孔洞的濾膜上加入一層 30 μg type I collagen (Millipore, MA, USA) 等待風乾一小時後，種入 10^4 的 TSGH-8301 cells 於 chamber 內 (加入蜂肽或不處理蜂肽)，chamber 放於 24-well 中，讓細胞自由移動 24/48 小時，移除上清液後，用甲醇固定細胞，再以 2% 的結晶紫染細胞，成功移動的細胞會跑到 chamber 下面，在倒立式顯微鏡下會呈現明顯的藍紫色細胞型態。
3. Invasion Assay：將表面有 8 μm 大小孔洞的濾膜上 coating 上 30 μg Englebreth-Holm-Swarm sarcoma tumor extract (EHS Matrigel Basement Membrane Matrix) 等待風乾一小時後，種入 10^4 的 TSGH-8301 cells 於 chamber 內 (加入蜂肽或不處理蜂肽)，chamber 放於 24-well 中。讓細胞自由移動 24/48 小時，移除上清液後，用甲醇固定細胞，再以 2% 的結晶紫染細胞，成功侵襲的細胞會跑到 chamber 下面，在倒立式顯微鏡下會呈現明顯的藍紫色細胞型態。

十五、統計分析 (Statistics analysis)

實驗結果以平均值標準差 (mean \pm SD) 表示，使用 Student's *t*-test 來決定實驗組與對照組之差異。* 表示 $p < 0.05$ ，當 p 值小於 0.05 以下時，則認為具統計上意義。** 表示 $p < 0.01$ ，當 p 值小於 0.01 以下時，則認為具統計上顯著差異。*** 表示 $p < 0.001$ ，當 p 值小於 0.01 以下時，則認為具統計上非常顯著的差異。

第六章 實驗結果

第一節 蜂肽 (Bee venom)對人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301 cells)生長之影響

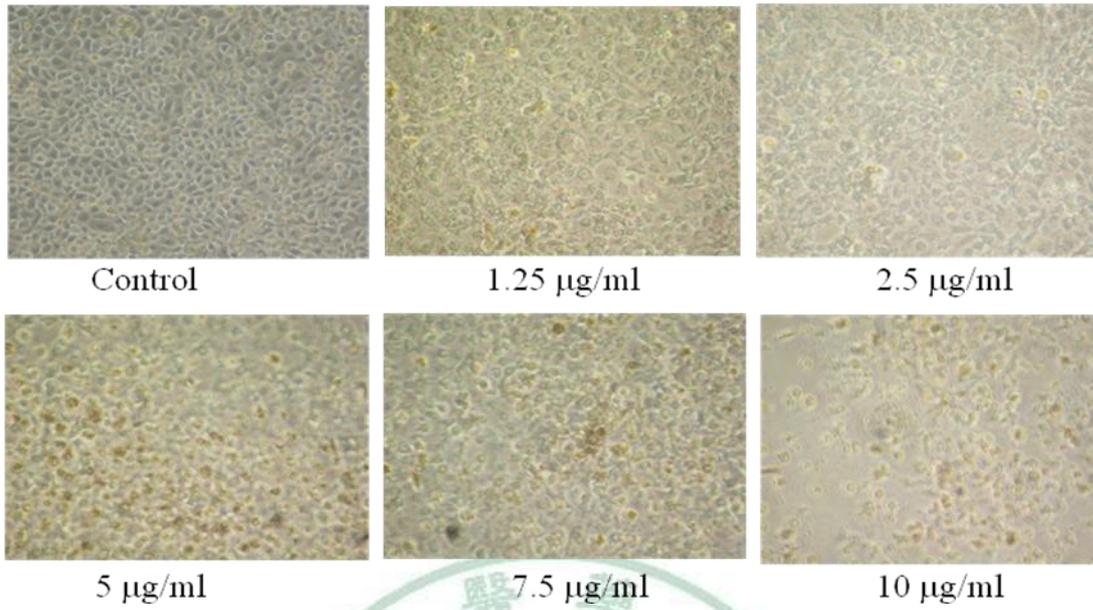
一、 Viability (存活率)：蜂肽對 TSGH-8301 細胞存活率之影響。

首先將購自 sigma 的蜂肽 (Bee venom)配成不同濃度：2.5、5、7.5、10、20 $\mu\text{g/ml}$等，分別加入 2×10^5 cell/well 定量的細胞中，依照實驗需要的不同時間點，用倒立式顯微鏡觀察細胞型態，而用流式細胞儀來測量其存活率。經 PI 染色後的細胞，螢光強度較高者為死細胞，螢光強度較弱者為活細胞。最後再以 sigma plot 統計分析出 TSGH-8301 細胞經蜂肽處理後之存活率。

本實驗以倒立式顯微鏡觀察並紀錄蜂肽對於 TSGH-8301 細胞型態的影響。如圖 5-1 我們可以發現到不同濃度的蜂肽作用於細胞 24、48 小時後，隨著蜂肽濃度的改變，細胞數量及型態上都有明顯的改變。分別討論蜂肽對於 TSGH-8301 細胞的毒殺效果是否有呈現劑量上的變化 (Dose dependent)，由圖 5-2 我們可以從量化表上得知，蜂肽在 24、48 小時對於 TSGH-8301 細胞的毒殺能力是隨著劑量上升而增加的，這顯示蜂肽對於 TSGH-8301 細胞的毒殺效果具有劑量上的效應。

利用存活率之試驗，以蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 作用於 TSGH-8301 細胞 24 小時後之存活率，可達半數致死率。故以蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 作為之後大部分實驗的濃度依據。

(A)



(B)

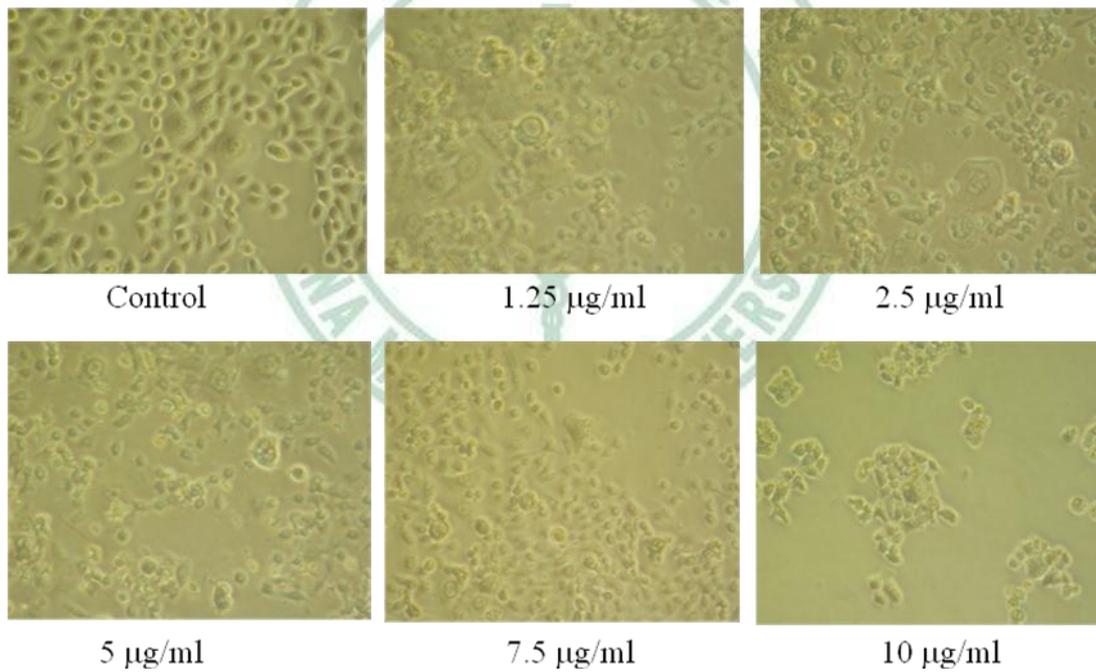


圖 6-1 利用倒立式顯微鏡觀察不同濃度的蜂肽作用 TSGH-8301 細胞型態之變化。觀察到 TSGH-8301 cells 隨著蜂肽濃度上升呈現明顯皺縮現象。(A)24 小時 (100 X)，(B)48 小時 (200 X)

(B)

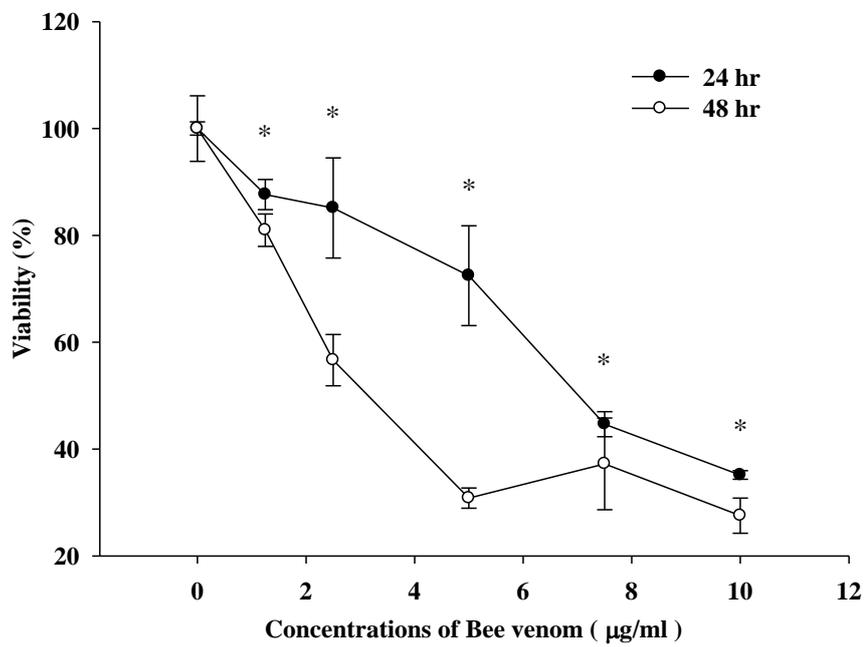
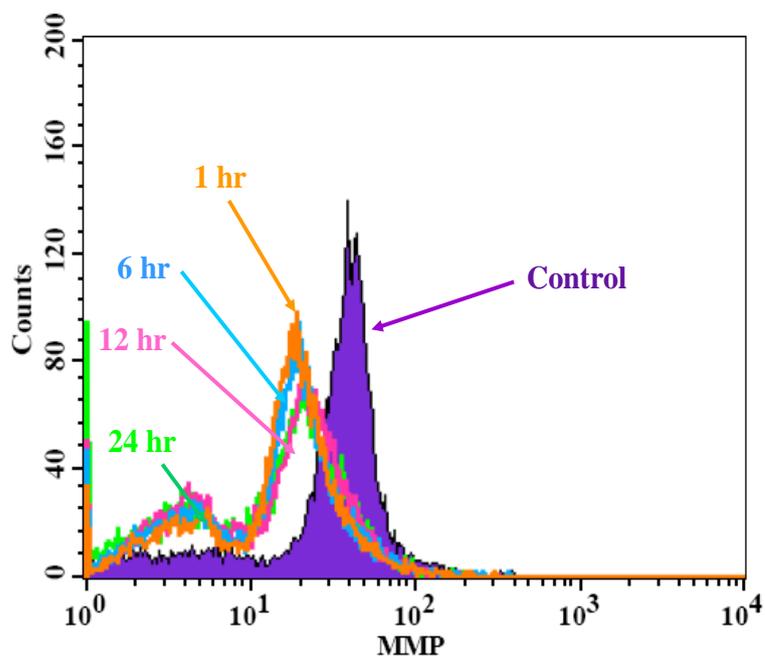


圖 6-2 以不同濃度的蜂肽，分別培養於 TSGH-8301 細胞 24、48 小時之後，其存活率變化之統計量化圖，可發現隨著蜂肽濃度增高存活率有明顯的下降。*表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

二、 利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 之影響。

本實驗主要是利用流式細胞儀與 DiOC₆ 螢光染劑去偵測粒線體膜電位的改變，可由圖 5-4 可得知當 TSGH-8301 細胞在蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 共同培養 0、1、6、12、24 小時後，結果顯示一小時後粒線體膜電位即有大幅的下降。

(A)



(B)

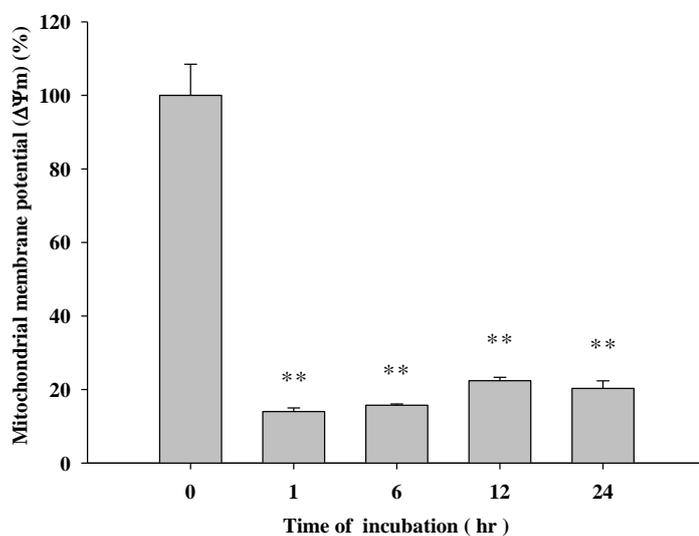


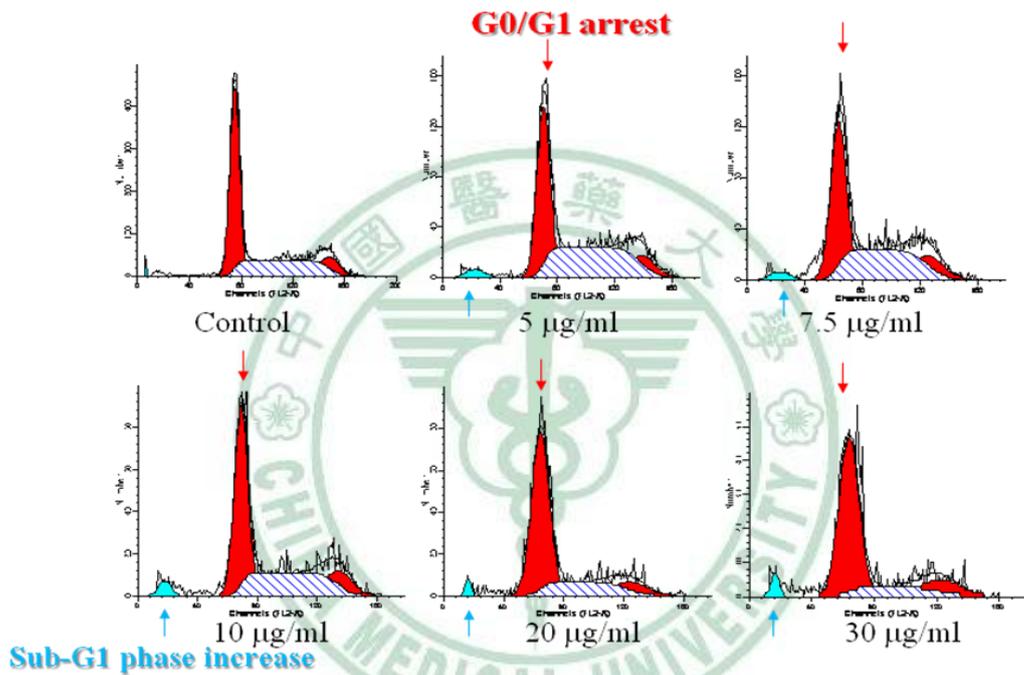
圖 6-3 蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 分別作用 TSHGH-8301 細胞 0, 1, 6, 12, 24 小時，其粒線體膜電位之變化。(A)流式細胞儀分析細胞內膜電位之變化分析圖。(B)細胞內粒線體膜電位變化之量化統計圖，**表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.01$ 。



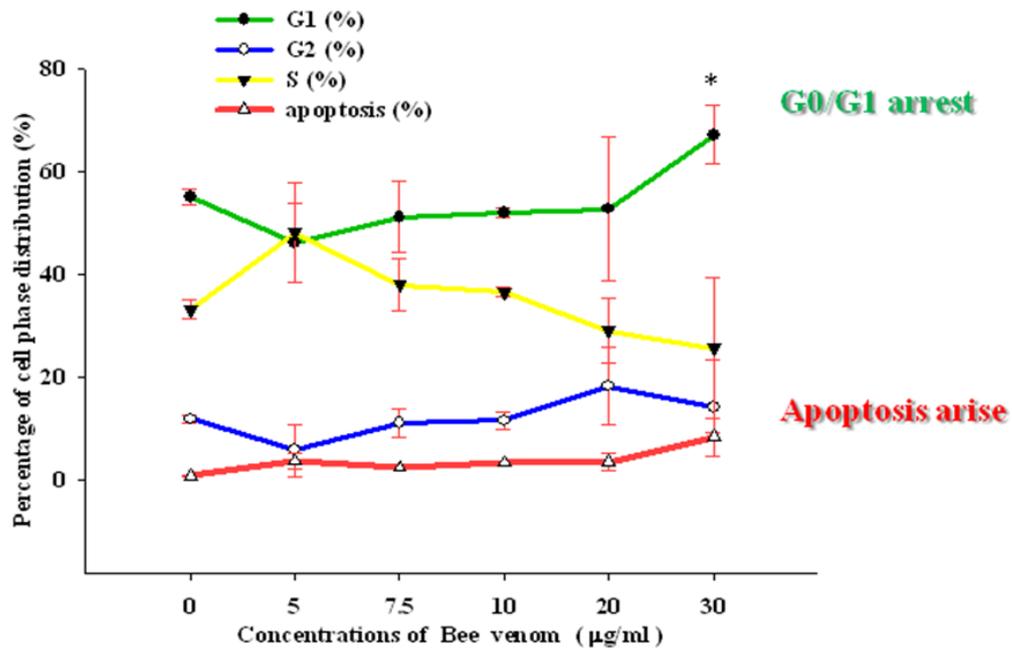
三、 利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞週期之影響。

而本實驗結果可由圖 5-5 得知，當 TSGH-8301 cells 與不同濃度蜂肽共同培養 24 小時後，處於 SubG1 期的細胞百分比隨著蜂肽濃度越高而上升(0.8~8%)，且有顯著的細胞凋亡 (apoptosis)的現象發生；在 G0/G1 期的細胞則由 54.91% 上升至 66.97%，隨著蜂肽濃度的增高可發現細胞停滯在 G0/G1 期。

(A)



(B)



(C)

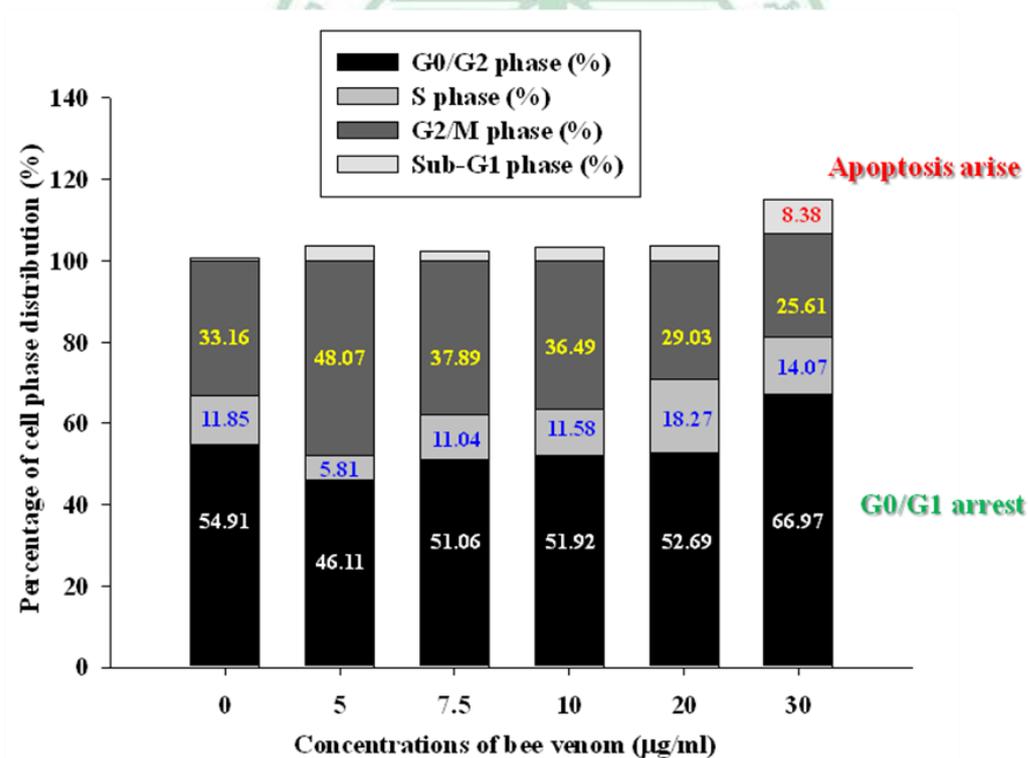


圖 6-4 不同濃度的蜂肽作用 24 小時，其細胞週期的變化。(A)流式細胞儀分析細胞週期變化之分析圖。(B)各不同濃度蜂肽之細胞週期量化統計圖。*表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。(C)不同濃度蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞週期百分比分布圖。

四、 利用流式細胞儀檢測蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞之 DNA 受損之影響。

(一) 以彗星試驗觀察 DNA 拖尾情形之分析

本實驗利用 PI 染色，觀察其 DNA 拖尾的現象，脫尾現象越長，表示 DNA 受損情況越嚴重。本實驗結果可由圖 5-6 得知，不同濃度的蜂肽與 TSGH-8301 cells 共同培養 24 小時後，可發現隨著濃度的增加其細胞拖尾的現象也越明顯，表示 DNA 受損的越嚴重。

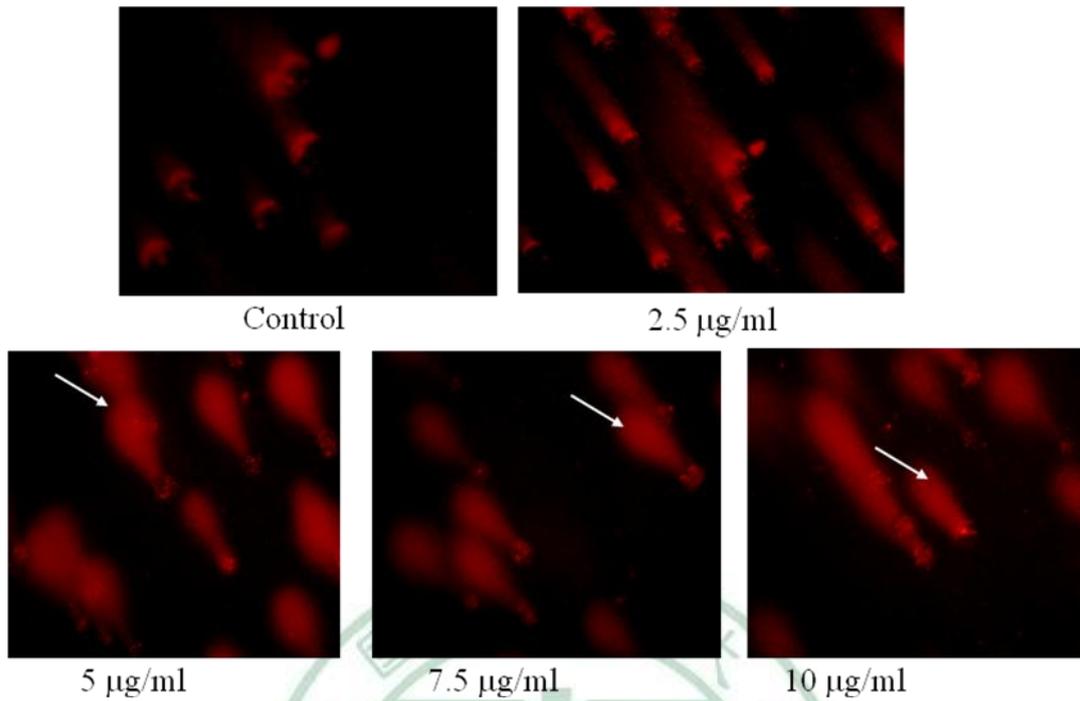
(二) 以 DAPI 染色法觀察 DNA 受損之情況

本實驗利用 DAPI (4-6-diamidine-2-phenyl indole) 染劑會專一性的與 DNA 結合，在螢光顯微鏡下所觀察到的螢光強度也會增加，表示 DNA 斷裂的情形越嚴重。結果可由圖 5-7 可得知，TSGH-8301 cells 與不同濃度的蜂肽共同培養 24 小時後，可發現隨著濃度的增加其螢光強度明顯增強，而細胞數也明顯減少。

(三) 以膠體電泳法觀察 DNA 片斷化之現象

在 DNA 膠體電泳 (DNA gel electrophoresis) 中可以觀察到呈階梯狀分布 (DNA ladder)。本實驗結果由圖 5-8 可得知，TSGH-8301 cells 與不同濃度的蜂肽共同培養 24 小時後，在蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 有明顯的 DNA ladder 產生，則表示蜂肽造成 TSGH-8301 cells 的 DNA 傷害。

(A)



(B)

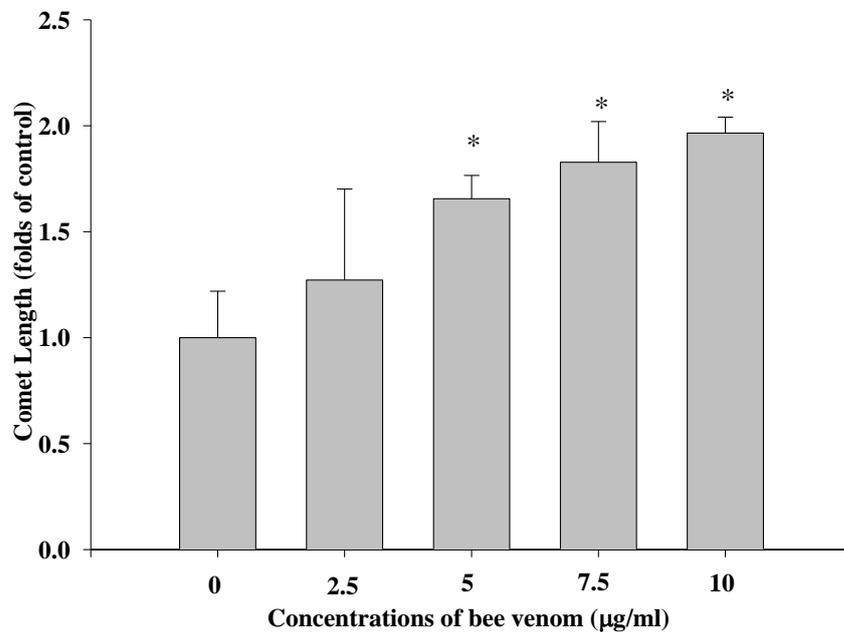


圖 6-5 以不同濃度之蜂肽 (2.5, 5, 7.5, 10 µg/ml) 作用於 TSGH-8301 cells 共同培養 24 小時後，以 (A) 彗星試驗觀察拖尾現象 (B) 分析量化拖尾程度 (200 X)。* 表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

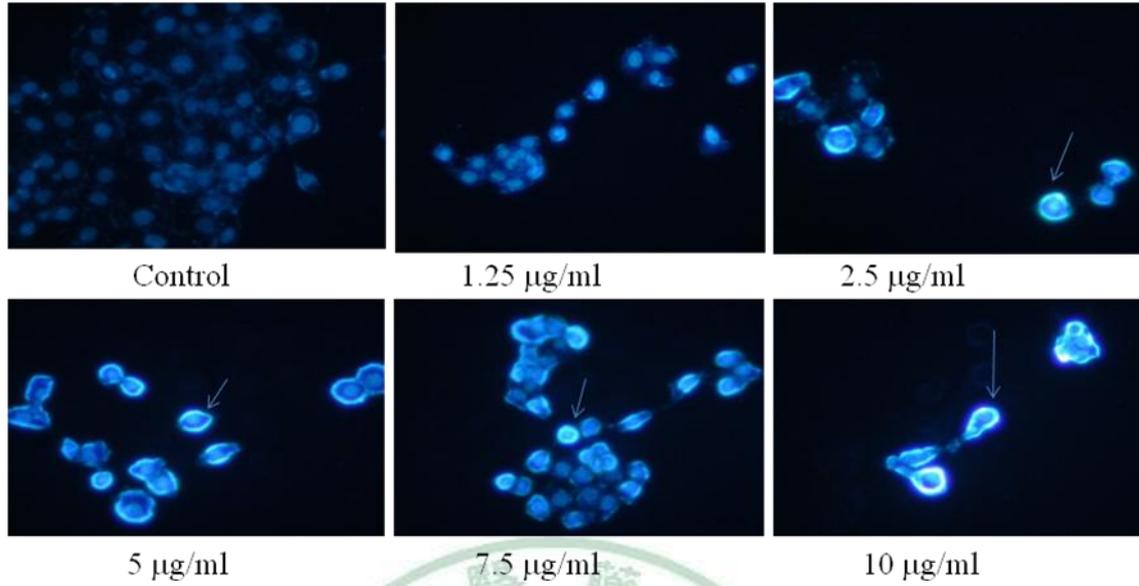


圖 6-6 以不同濃度之蜂肽 (1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g/ml}$)作用於 TSGH-8301 細胞培養 24 小時，以 DAPI 染色法觀察 DNA 受損之情況。

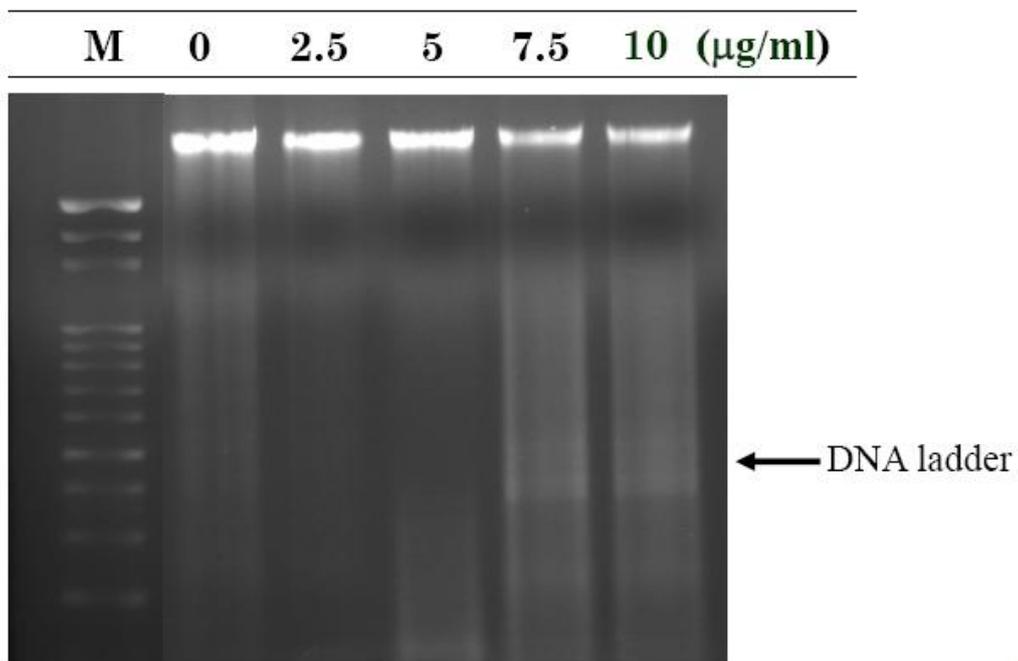


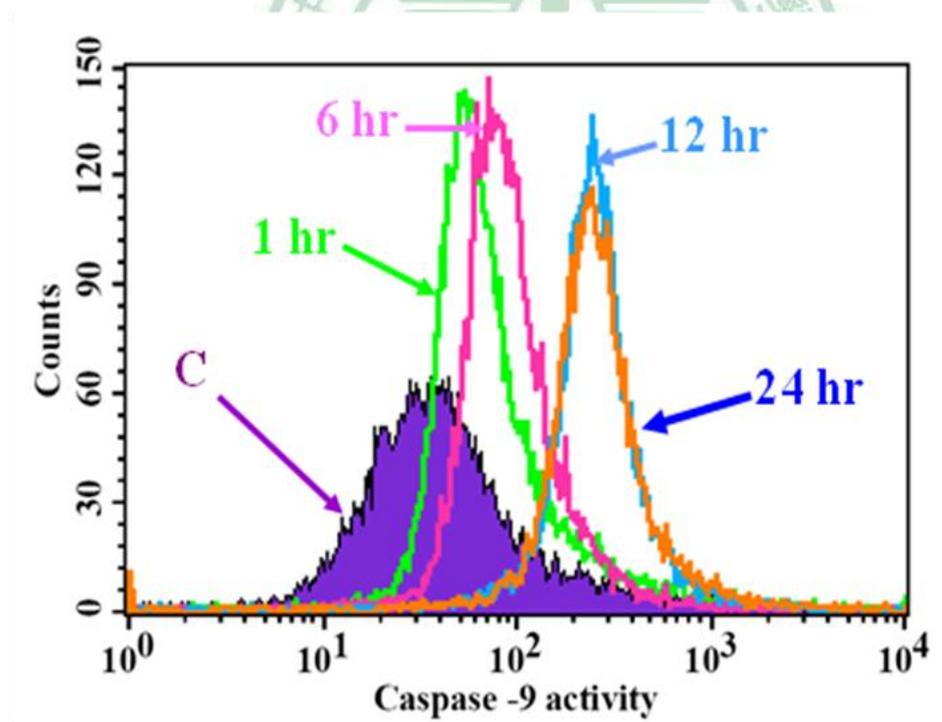
圖 6-7 以不同濃度蜂肽 (2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g/ml}$)作用於 TSGH-8301 cells 共同培養 24 小時，以 DNA 膠體電泳觀察其 DNA 片段化之情況。

五、蜂肽 (bee venom)對人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells)

caspase-3, -8, -9 活性之探討

本實驗主要是利用流式細胞儀偵測 CaspaLux kit 來偵測細胞內 caspase-3, -8, -9 活性之變化，螢光強度越強則表示 caspase-3, -8, -9 活性越高。結果可由圖 5-9 可得知，TSGH-8301 cells 經蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理不同時間點之後，我們可發現螢光強度明顯增強，表示 caspase-3, -8, -9 活性確實有上升，蜂肽可能同時經由內在與外在路徑來造成細胞凋亡。

(一)、以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 活性之分析圖以及量化統計



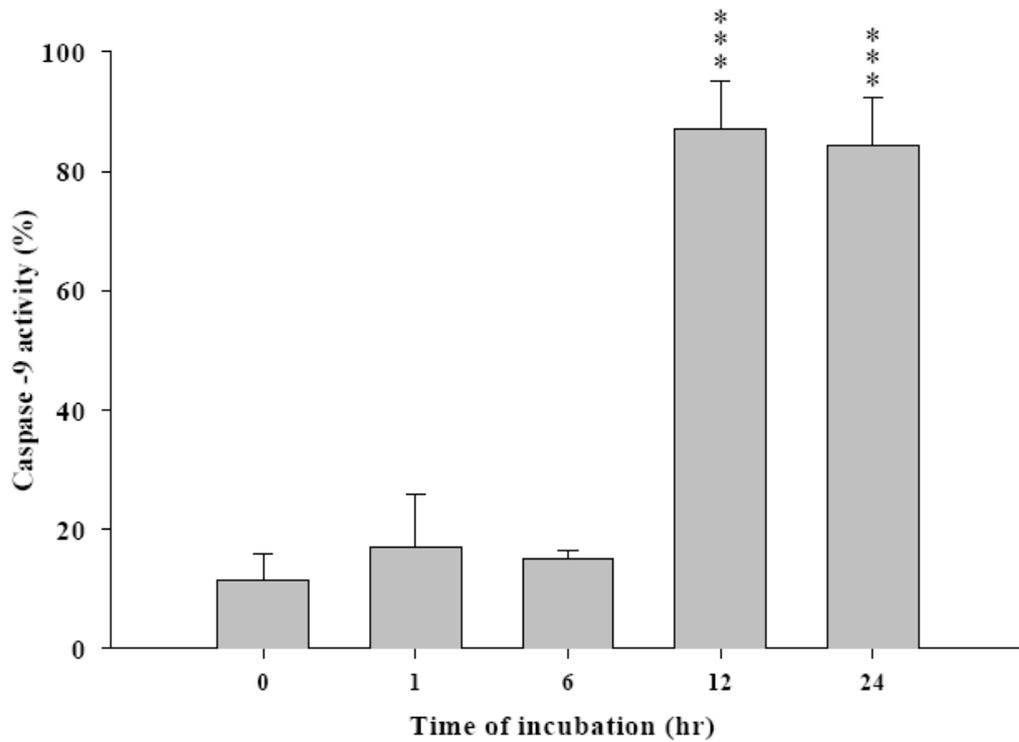


圖 6-8 以蜂肽 10 µg/ml 作用於 TSGH-8301 cells 不同時間點，以 CaspaLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-9 活性的變化。(A)以流式細胞儀分析細胞內 caspase-9 活性之分析圖以及量化統計圖。***表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.001$ 。

(二)、以流式細胞儀分析細胞內 caspase-8 活性之分析圖以及量化統計

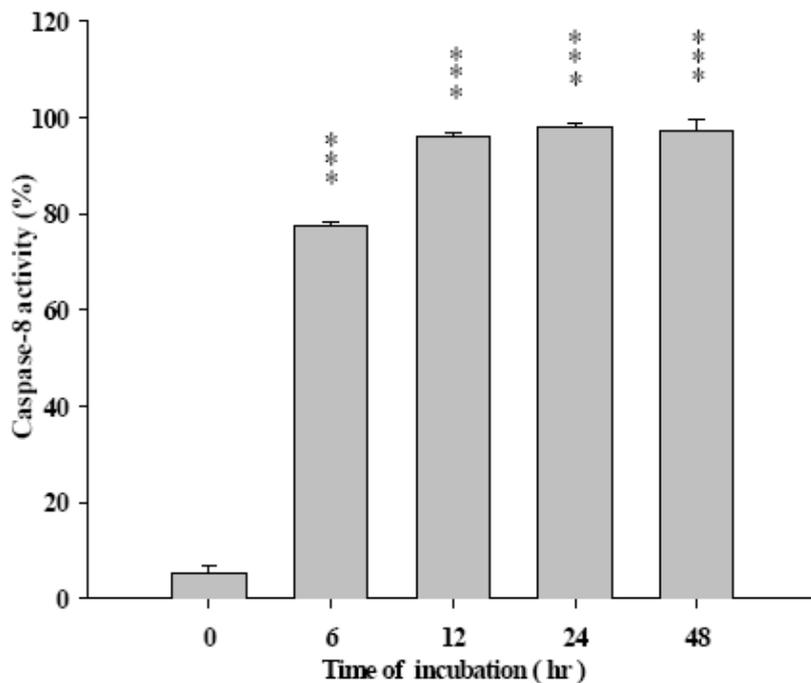
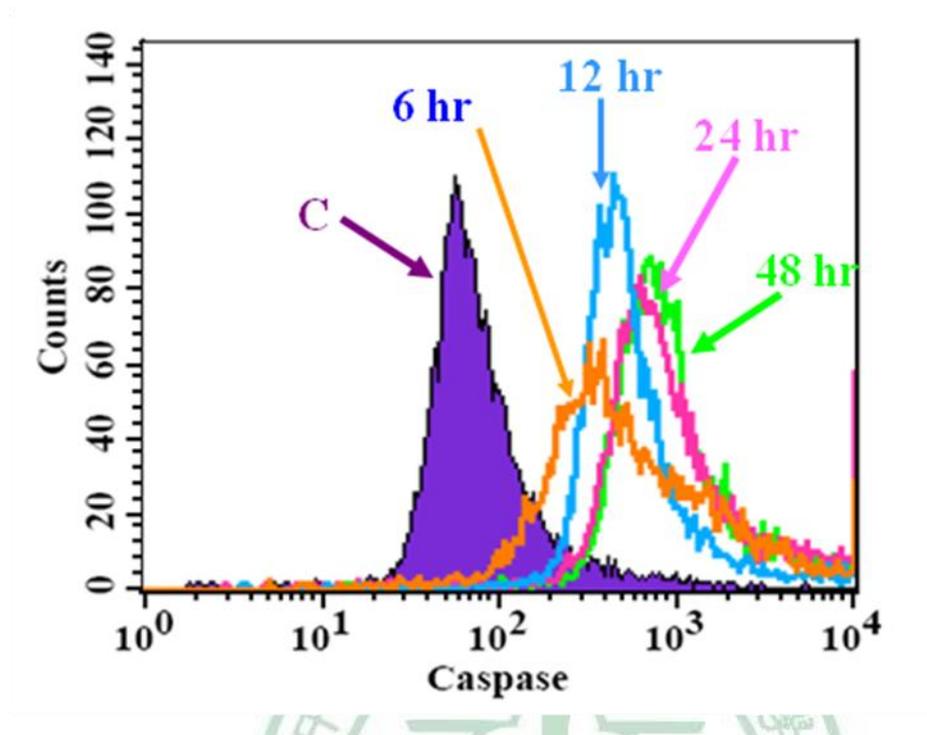


圖 6-9 以蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 作用於 TSGH-8301 cells 不同時間點，以 CaspaLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-8 活性的變化。(B) 以流式細胞儀分析細胞內 caspase-8 活性之分析圖以及量化統計圖。***表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.001$ 。

(三)、以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 活性之分析圖以及量化統計

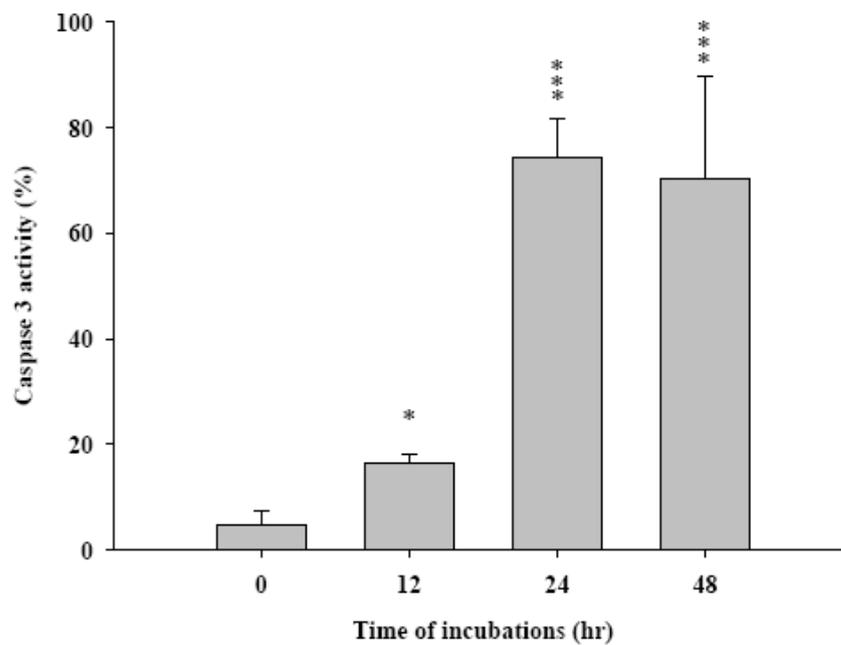
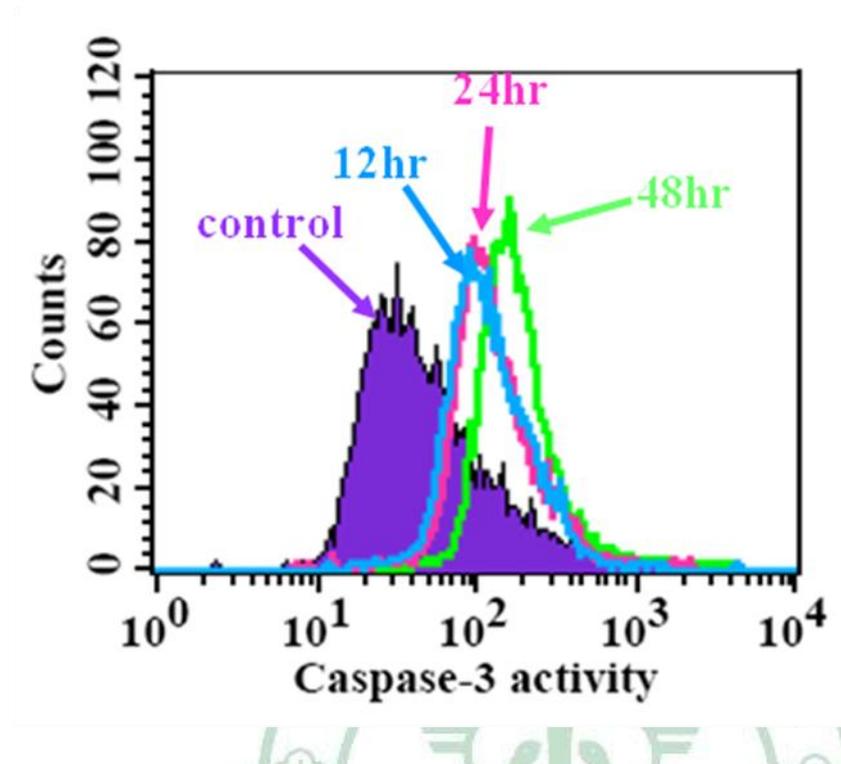


圖 6-10 以蜂肽 $10 \mu\text{g/ml}$ 作用於 TSGH-8301 cells 不同時間點，以 PhiPhiLux 螢光染劑分析細胞內 caspase-3 活性的變化。(C) 以流式細胞儀分析細胞內 caspase-3 活性之分析圖以及量化統計圖。***表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.001$ 。

第二節、以西方墨點法探討蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞死亡之相

關蛋白表現

一、探討有關細胞週期停滯 (cell cycle arrest)之相關蛋白

本實驗以流式細胞儀偵測並觀察蜂肽對人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301 cells) 細胞週期變化，發現 TSGH-8301 細胞經由蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理後，細胞週期停滯在 G0/G1 期。因此利用西方墨點法觀察一些調控 G0/G1 期相關蛋白之變化，一般來說細胞 DNA 受到損傷時，細胞週期會停滯，此時會誘導腫瘤抑制基因 (tumor-suppressor gene) p53 的表現，p21 會抑制 Cdk-cyclin complexes (例如 Cdk2/6-cyclin E/D)使細胞週期停滯在 G0/G1 期，但是如果 DNA 受損嚴重，p53 表現增強而活化了某些基因的表現，使細胞走向細胞凋亡。另外 chk1/2 會抑制 Cdk6/2 complex 和 cyclin D/E 結合而使細胞週期停滯。由圖 5-11 可得知，當 TSGH-8301 cells 與蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理後，發現隨著時間的增加，p53 的蛋白表現量上升，且 p21 表現量也增加。而其下游的 Cdk-cyclin complexes (Cdk2/6-cyclin E/D)表現量減少。而上游的 chk2 的表現量則隨著作用時間增加。由這些結果可以再一次的證明人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301 cells)經蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 作用後，其細胞週期確實停滯在 G0/G1 期。

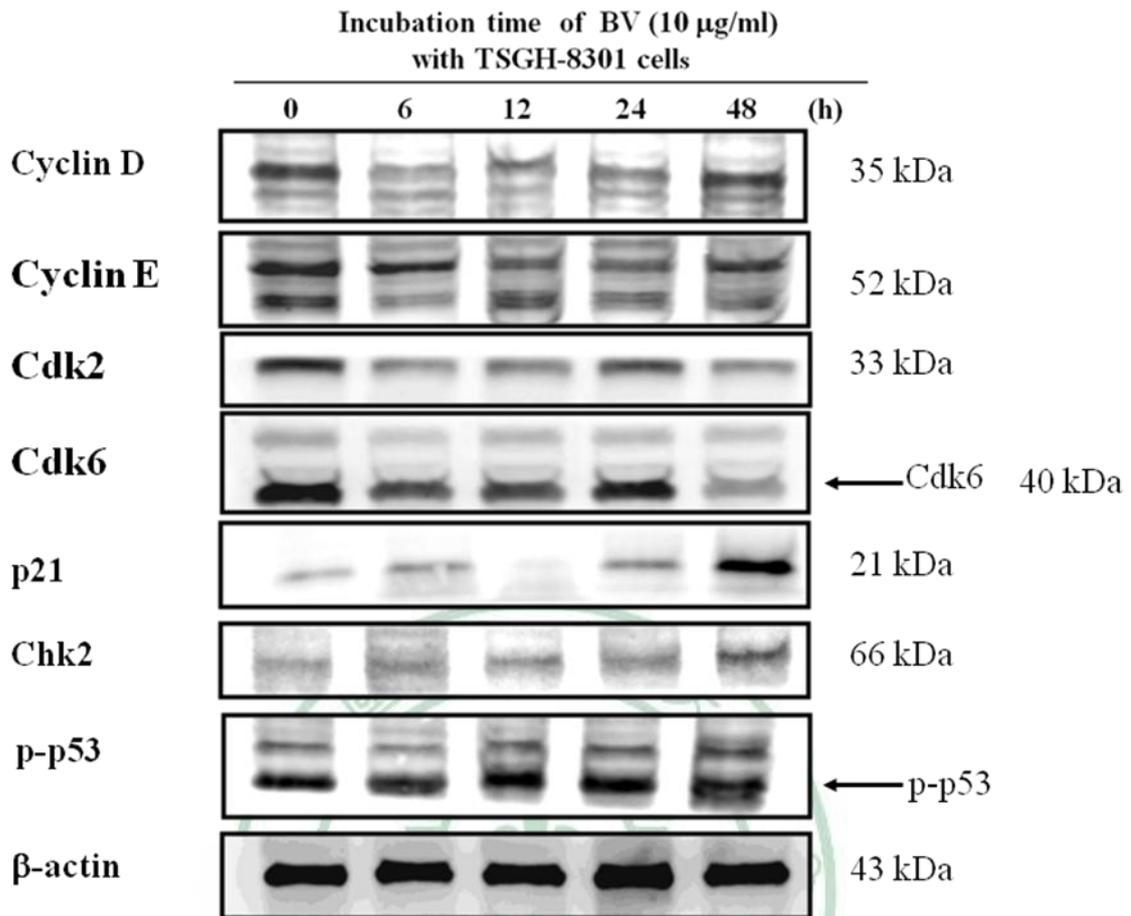
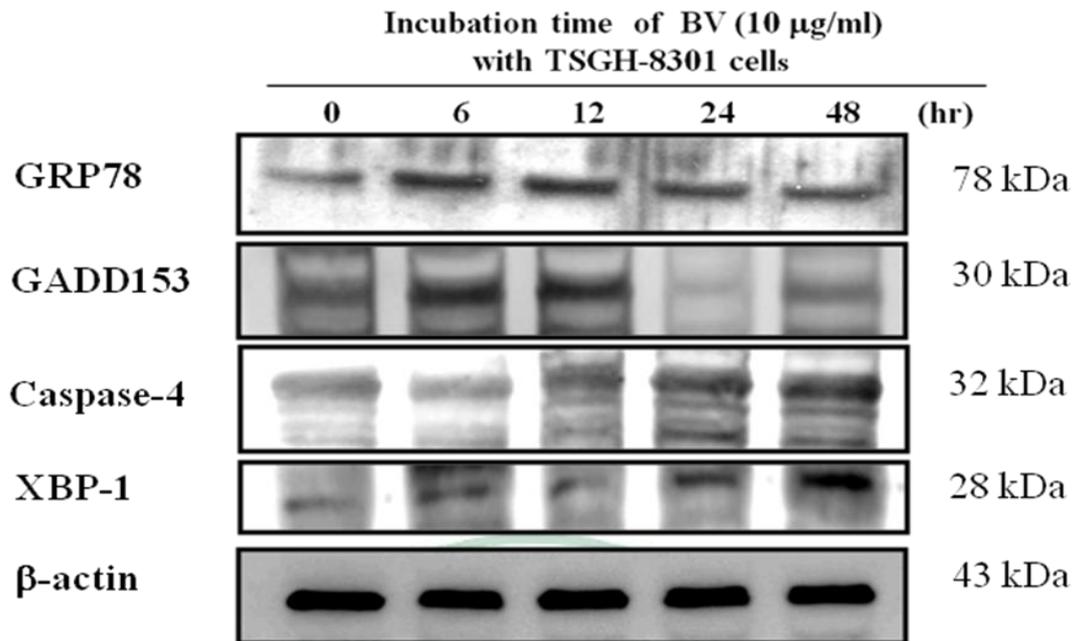


圖 6-11 以 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽處理不同時間之人類膀胱癌細胞(TSGH-8301)，利用西方墨點法檢測有關 G0/G1 期之細胞週期停滯相關蛋白 (如：p21, p53, cyclin D、E, cdk2、6, chk2)之表現變化。

二、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡內質網壓力路徑 (endoplasmic reticulum-ER stress dependent apoptotic pathway)之相關 蛋白表現

內質網在細胞內調控著許多細胞內生理現象，像是胞內鈣離子濃度的調節、蛋白質分泌及脂質合成。內質網內腔的特殊細胞環境，有著最高濃度的鈣離子濃度以及許多 Ca^{2+} -ATPase 轉運蛋白的特殊細胞環境。若是細胞受到許多外界因素干擾或壓力，也可能會造成內質網上堆積許多未折疊完全的蛋白質。而這些未成熟的蛋白質將會產生一種稱作未摺疊蛋白反應 UPR (unfolded protein response)⁽⁷⁷⁾，在這裡我們探討 UPR 訊息傳遞在細胞凋亡中各相關蛋白之表現量。當內質網中的未摺疊蛋白累積越多，便會產生 GRP78 這類伴護質幫助蛋白質摺疊。當 GRP78 釋出即會啟動 UPR。當 UPR 啟動後可能直接活化一些未摺疊完全蛋白質 (PERK、IRE1 α 、ATF6 α)。這些重要的轉膜訊息蛋白在 ER stress 下也有改善蛋白質摺疊錯誤的功能。IRE1 α 可活化 caspase-4 以及轉錄後修飾 XBP-1 蛋白的表現，另外 ATF6 裂解後也會產生 UPR，最後造成細胞自體吞噬 (autophagy) 而死亡。由圖 5-12 可得知蜂肽對 TSGH-8301 cells 造成內質網壓力，進而造成細胞死亡。

(A)



(B)

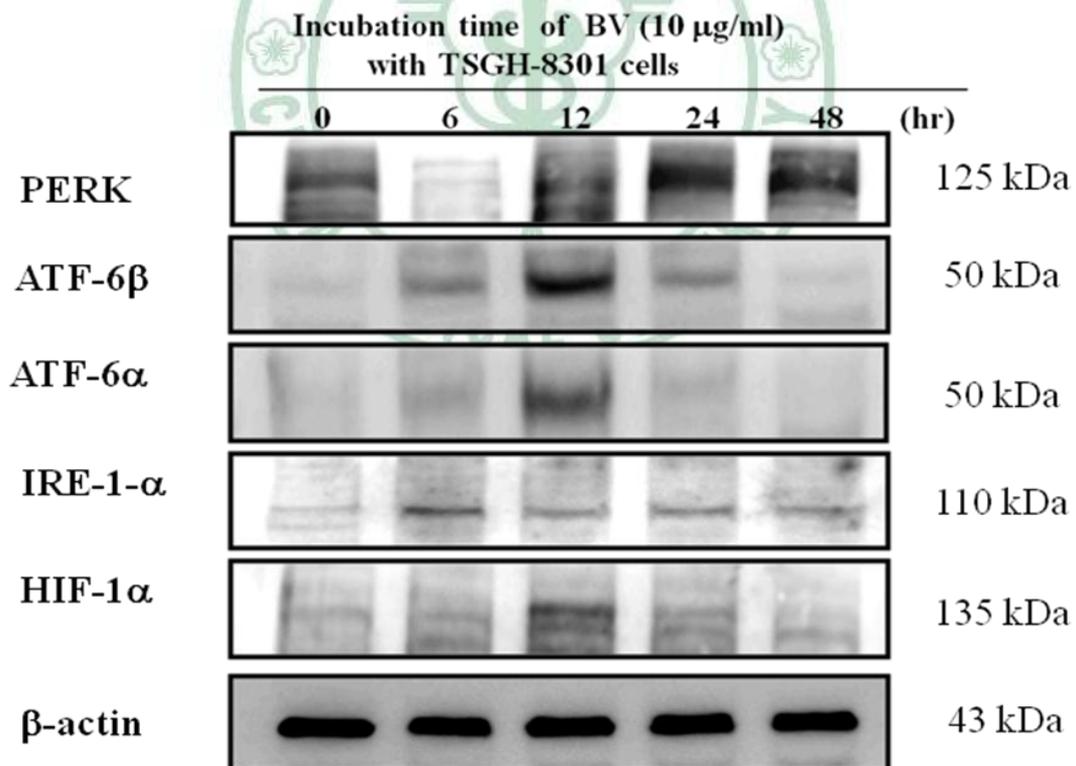


圖 6-12 以 10 μ g/ml 蜂肽處理不同時間之人類膀胱癌細胞(TSGH-8301)，利用西方墨點法檢測有關 ER stress 相關蛋白 (如：GRP78, GADD153, caspase-4, XBP-1, PERK, ATF6, IRE1, HIF)之表現變化。

三、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡粒線體路徑

(mitochondria-dependent apoptotic pathway)之相關蛋白表現

當細胞內質網受到壓力時，鈣離子釋出至細胞質而後細胞質鈣離子濃度會過高，接著粒線體吸收了大量的鈣離子，引起粒線體膜電位的下降且促進了粒線體凋亡路徑的生成，調控許多下游凋亡相關蛋白。首先先介紹 Bcl-2 family 蛋白，包含了 1.pro-apoptosis 蛋白 (Bax、Bid、Bcl-Xs)。2.anti-apoptosis 蛋白(Bcl-2、Bcl-X_L)。當 p53 表現量上升時，會活化 p21 蛋白進而影響下游的 Bax 蛋白表現量上升。而 Bax 會抑制 Bcl-2 蛋白的作用，造成粒線體膜電失衡，引發細胞凋亡媒介蛋白釋出至細胞質 (Cytochrome *c*, AIF, Endo-G 等)。AIF 由粒線體釋出後會進入細胞核內去攻擊 DNA 造成 Genome digestion，而細胞核啟動修復 DNA 的機制，PARP 便是一個具有修復 DNA 功能的蛋白。當 cytochrome *c* 活化了 caspase-9 然後活化了 caspase-3，而 caspase-3 會去裂解 PARP 使其失去修復 DNA 的功能，使細胞最終走向凋亡，為粒線體凋亡路徑 (mitochondria-dependent apoptotic pathway)。在本實驗中，當 TSGH-8301 cells 與蜂肽 10 µg/ml 共同處理後，由圖 5-13 可觀察到隨著時間增加，p53 蛋白表現量上升，p21 表現量增加，Bax 表現量增加，AIF、Endo-G、Cytochrome *c* 在細胞質的表現量皆上升。另外抑制 caspase family 的蛋白 XIAP 的表現量也隨著時間的增加而減少，更證明了 caspase-dependent apoptotic pathway 已被啟動。另外 DNA 修復蛋白 PARP 也明顯的被裂解，證明確實有 DNA 傷害的產生。

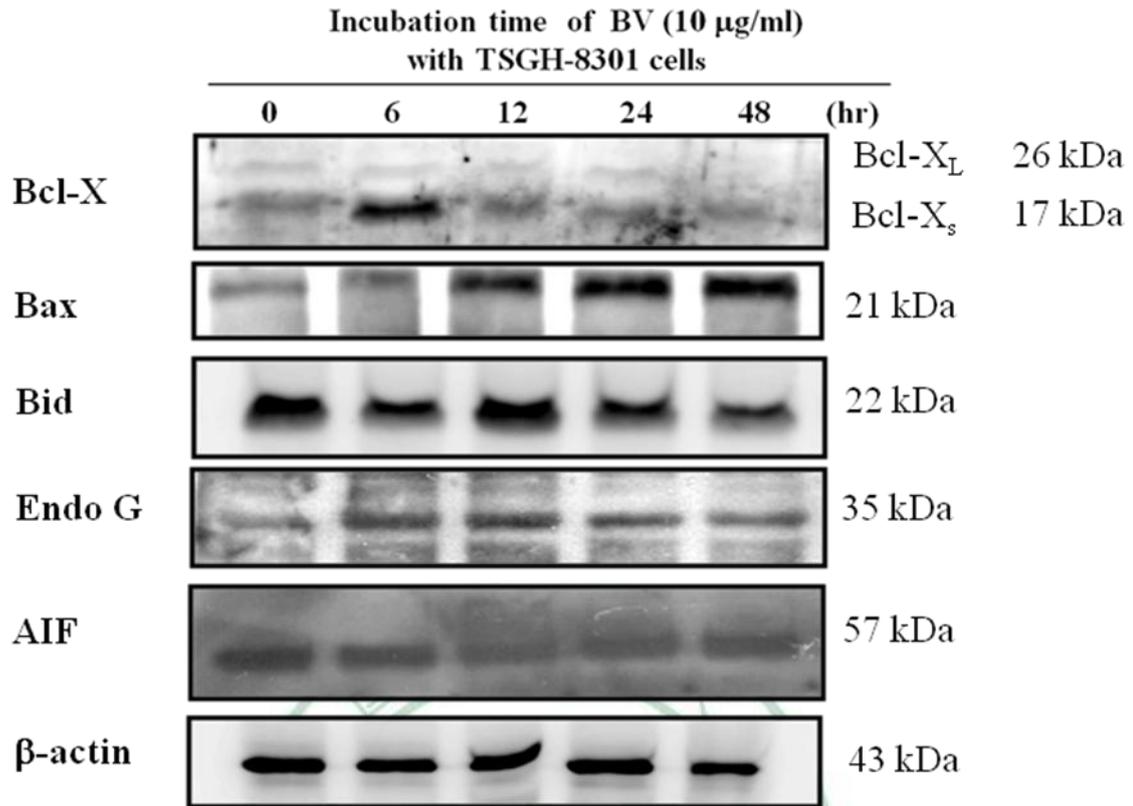


圖 6-13 以 10 μ g/ml 蜂肽蜂肽處理不同時間之人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301)，利用西方墨點法檢測有關粒線體相關蛋白，發現抑制了 Bcl-X_L，以及促進了 Endo G, AIF, Bax, Bid 以及 Bcl-X_S 等蛋白表現變化。

四、探討蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 細胞凋亡的外在路徑 (extrinsic pathway)之相關蛋白表現

當細胞走向凋亡時，被發現與許多死亡受器 (death receptor)有關，這些死亡受器大多為TNF (tumor necrosis factor receptor)的超級家族成員之一。Fas (CD95)、FasL (CD95 ligand)、TRAIL (tumor necrosis factor receptor-related apoptosis-inducing ligand)皆是重要的凋亡指標。當細胞受到外在刺激準備走向凋亡時，這些死亡受器會與連結蛋白FADD接合，並且與procaspase-8聚集在一起形成DISC (death initiating signaling complex)，準備傳遞死亡訊息給下游蛋白。然後活化caspase-8，再活化Bid以及caspase-3，最後使細胞走向凋亡一途。由圖5-14可得知，蜂肽10 µg/ml處理TSGH-8301 cells後，Fas、FasL、TRAIL這些死亡受器表現量確實有上升。Caspase-8、Bid的蛋白表現量也有上升的趨勢，顯示蜂肽確實可經由外在路徑使TSGH-8301 cells走向細胞凋亡。



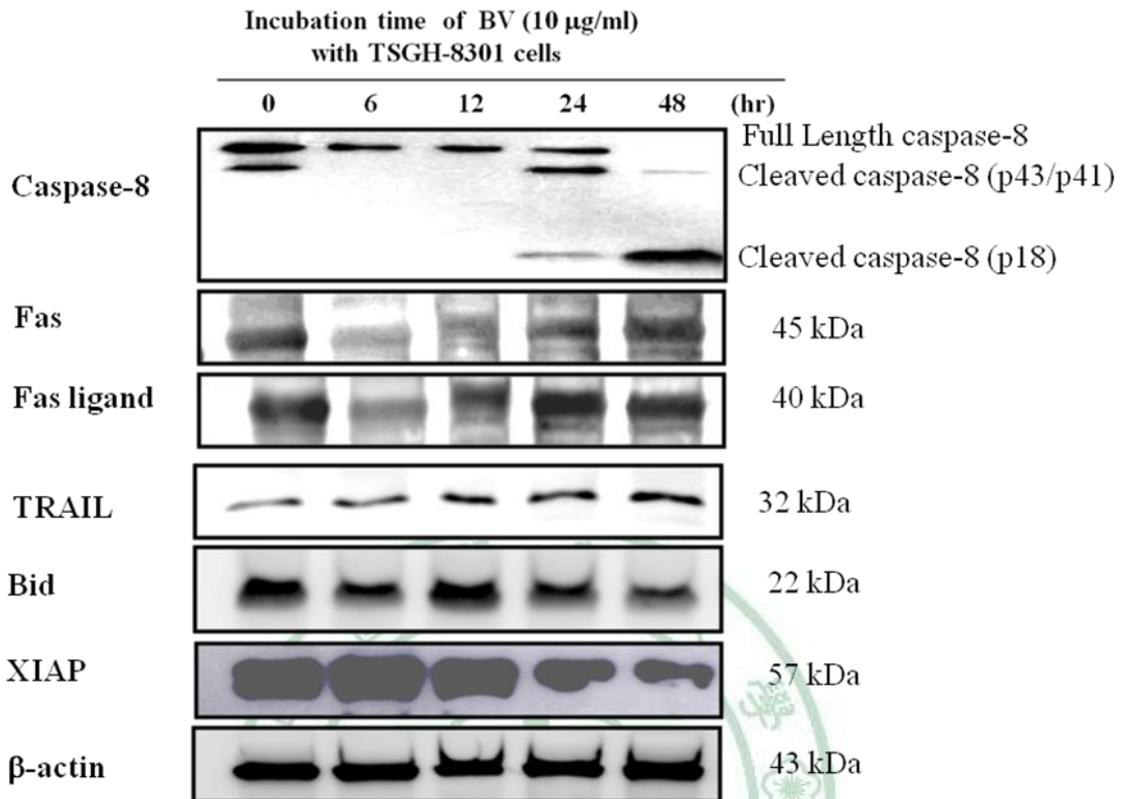


圖 6-14 以10 μ g/ml蜂肽處理不同時間之人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301)，利用西方墨點法檢測有關外在路徑相關蛋白 (如：TRAIL, Caspase-8, Fas, FasL, XIAP, Bid)之表現量變化。

五、探討蜂肽與 TSGH-8301 cells 的細胞凋亡之 caspase 家族相關蛋白表現

目前已知直接跟細胞凋亡相關的蛋白是 caspase-3，另外還有由粒線體所誘發的內在凋亡路徑相關蛋白是 caspase-9，以及由死亡受器所活化的外在凋亡路徑相關蛋白是 caspase-8。由圖 5-15 可得知，蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理 TSGH-8301 cells 後，caspase-3, -8, -9 的裂解態蛋白表現量確實上升了，確認細胞是經由活化 caspase 蛋白而走向細胞凋亡途徑的。

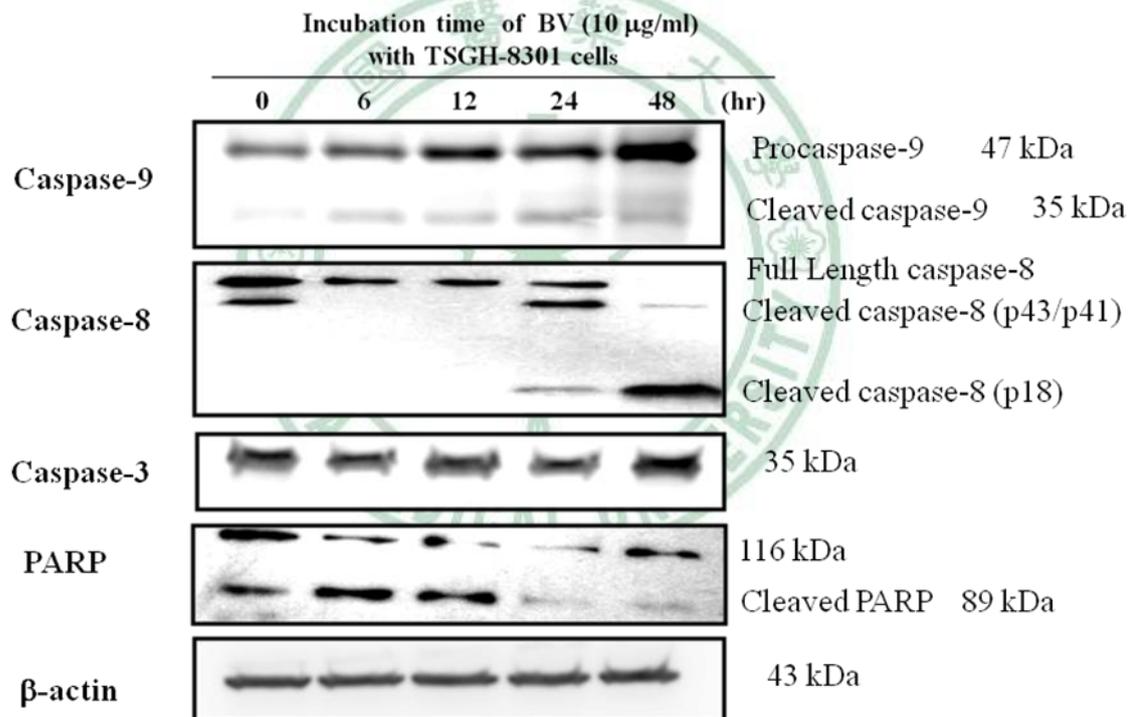


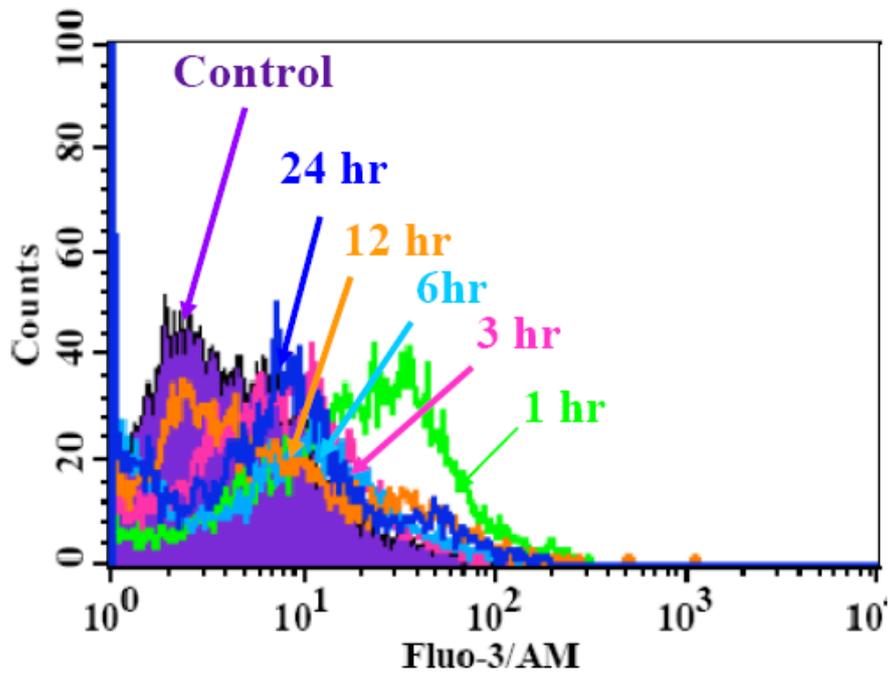
圖 6-15 以 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽處理不同時間之人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301)，利用西方墨點法檢測有關細胞凋亡之 caspase 相關蛋白 (如：caspase-3, -8, -9, PARP) 之表現改變。

第三節、探討蜂肽對 TSGH-8301 細胞凋亡是否被細胞胞內鈣離子濃度影響

一、蜂肽 (bee venom)對人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301 cells) 鈣離子釋放 (calcium release)之探討

細胞內鈣離子變化調控著許多細胞生理機制，像是：細胞增殖 (cell proliferation)、細胞週期過程 (cell cycle progression)、細胞凋亡 (apoptosis)、致癌基因訊息傳導 (oncogene signaling).....等等。鈣離子在細胞訊息傳導中，扮演著次級訊息傳遞者的角色，主要儲存於細胞的內質網與高基氏體中(>1 μM)，另外也有許多研究指出鈣離子的釋放在細胞凋亡過程中扮演著相當重要的角色。一般細胞質中的鈣離子濃度大約只有 100 nM。假若內質網受到外來的壓力，就會釋出大量的鈣離子去影響到粒線體膜電位 (Mitochondria membrane potential; $\Delta\Psi_m$)使粒線體膜電位下降，cytochrome *c* 由粒線體釋放至細胞質，接著促使細胞走向 caspase-9 dependent apoptotic pathway。本實驗是要探討人類膀胱癌細胞 (TSGH-8301 cells)以蜂肽處理後，細胞內鈣離子濃度的改變，利用流式細胞儀與鈣離子螢光染劑 (Fluo-3/AM)去偵測細胞內鈣離子濃度的變化，其結果可由圖 5-10 得知，再加入蜂肽處理不同時間後，在處理 1、3 小時就有大量鈣離子釋出的現象產生。

(A)



(B)

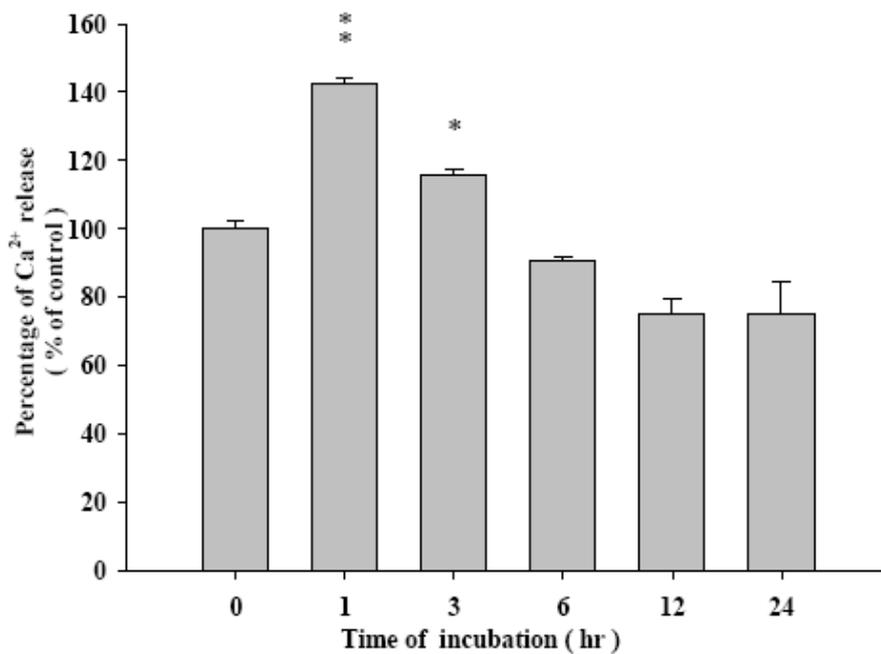
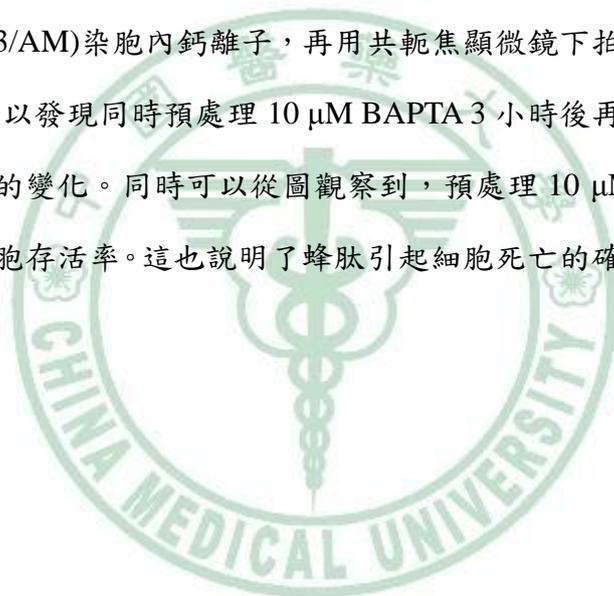


圖 6-16 以蜂肽 $10 \mu\text{g/ml}$ 作用於細胞 0, 1, 3, 6, 12, 24 小時後，細胞內鈣離子濃度的變化。(A)以流式細胞儀分析細胞內鈣離子濃度變化之分析圖。(B)細胞內鈣離子濃度變化之相對量化統計圖。*表示以 Student's *t*-test 進行分析各實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。**表示 $p < 0.01$ 。

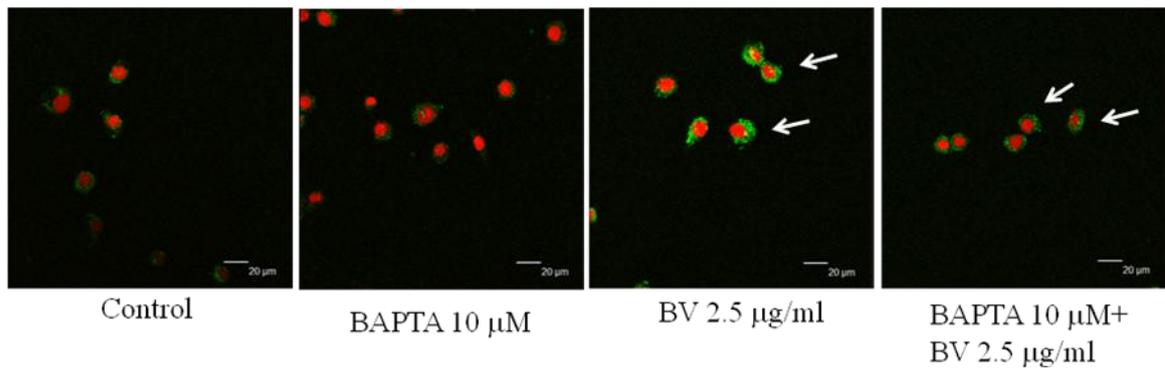
二、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內鈣離子濃度之改變。

另外近年來許多篇研究指出鈣離子可以影響細胞週期，細胞凋亡等途徑，本研究使用 BAPTA，他是一種鈣離子螯合劑，以類似 EDTA 的方式將細胞中的鈣離子抓住，降低細胞中鈣離子濃度，以觀察蜂肽是否經由鈣離子釋出途徑導致細胞凋亡。

我們預處理 10 μ M BAPTA 3 小時後，再加入蜂肽 10 μ g/ml 進行誘導，可以由圖可以發現單一處理 10 μ M BAPTA 對細胞並沒有特別的傷害，另外我們以鈣離子螢光染劑 (Fluo-3/AM) 染胞內鈣離子，再用共軛焦顯微鏡下拍攝綠色鈣離子螢光強度差異⁽¹¹²⁾。可以發現同時預處理 10 μ M BAPTA 3 小時後再加入蜂肽誘導的鈣離子並沒有明顯的變化。同時可以從圖觀察到，預處理 10 μ M BAPTA 3 小時後的确可以提升細胞存活率。這也說明了蜂肽引起細胞死亡的确是經由鈣離子釋出所引起的。



(A)



(B)

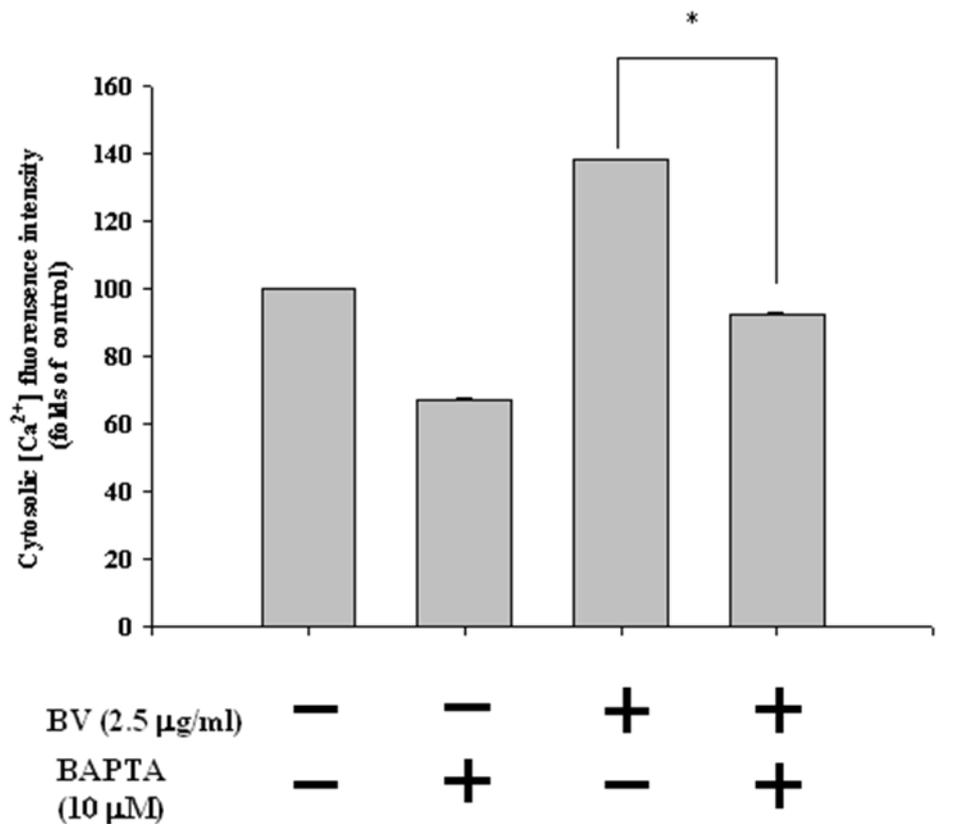


圖 6-17 預處理 BAPTA 3 小時後，可觀察到明顯抑制處理蜂肽 1 小時所誘導的鈣離子釋出至細胞質的現象，PI 紅色螢光染細胞核(A)以共軛焦顯微鏡觀察鈣離子螢光染劑 (Fluo-3/AM)綠色螢光表現量。(B)分析綠色鈣離子螢光螢光強度之量化統計圖。*表示以 Student's *t*-test 進行分析預處理 BAPTA 實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

三、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內存活率之改變。

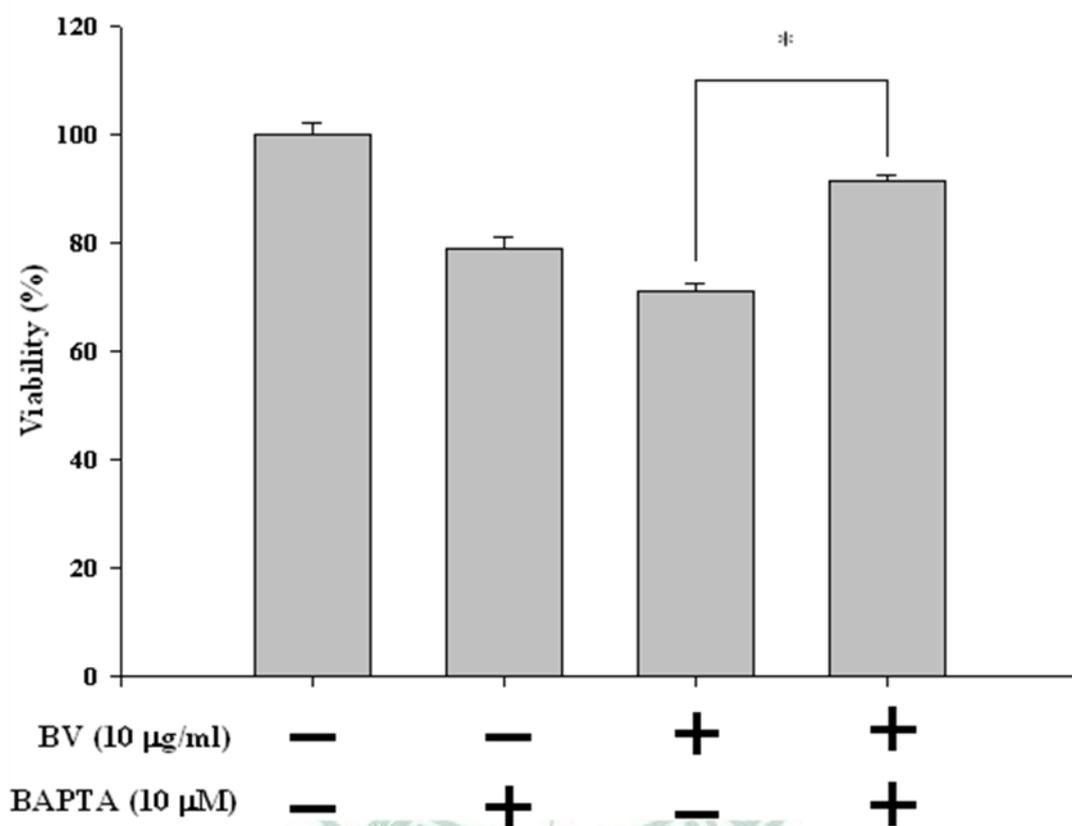
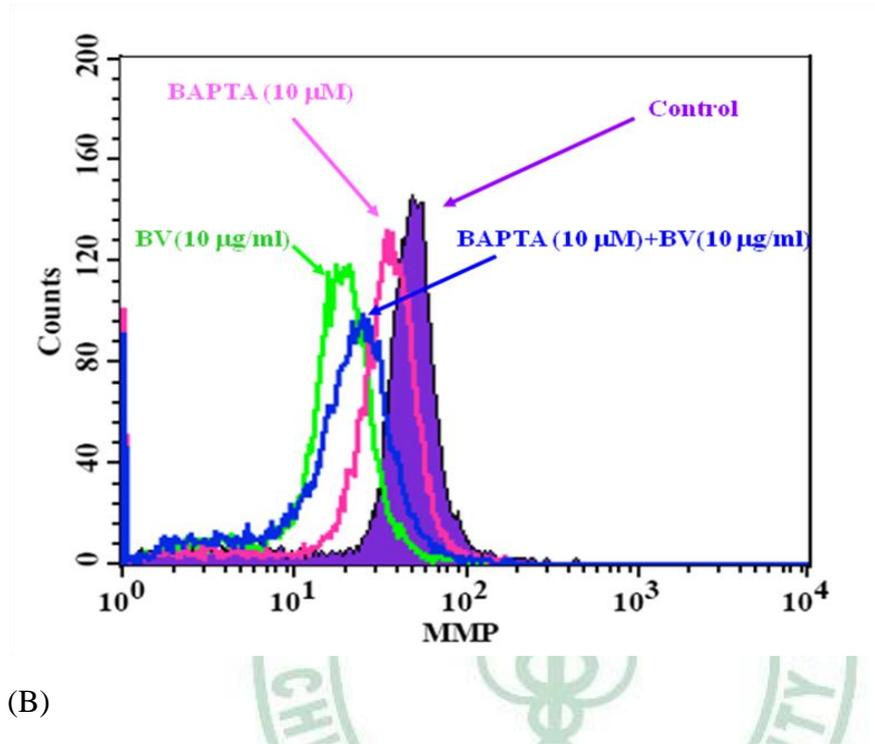


圖 6-18 預處理 BAPTA 3 小時後，可觀察到明顯抑制處理蜂肽 10 µg/ml 之流式細胞儀分析的 24 小時存活率。*表示以 Student's *t*-test 進行分析預處理 BAPTA 實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

四、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內粒線體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 之改變。

(A)



(B)

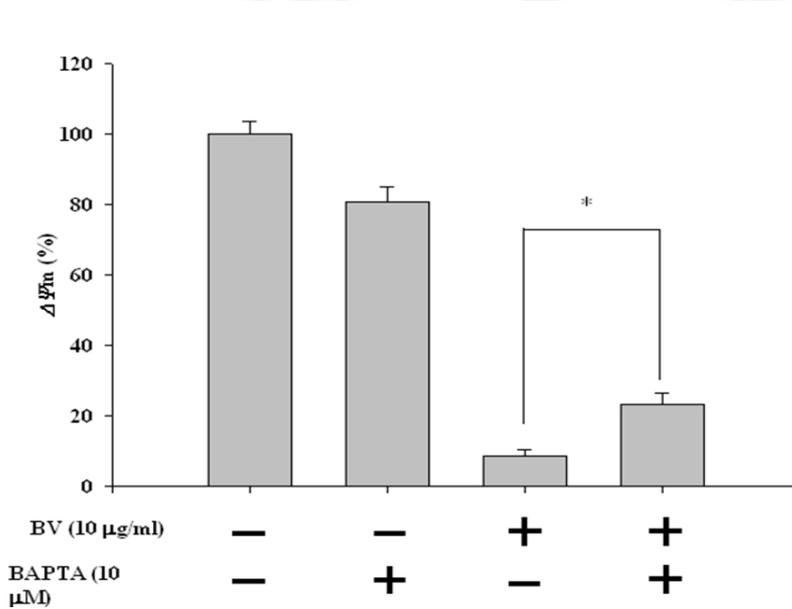


圖 6-19 預處理 BAPTA 3 小時後，可觀察到明顯抑制處理蜂肽 10 μg/ml 之流式細胞儀分析的粒線體膜電位下降程度。*表示以 Student's *t*-test 進行分析預處理 BAPTA 實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

五、預處理 BAPTA 後，對蜂肽處理 TSGH-8301 cells 細胞內相關蛋白之改變。

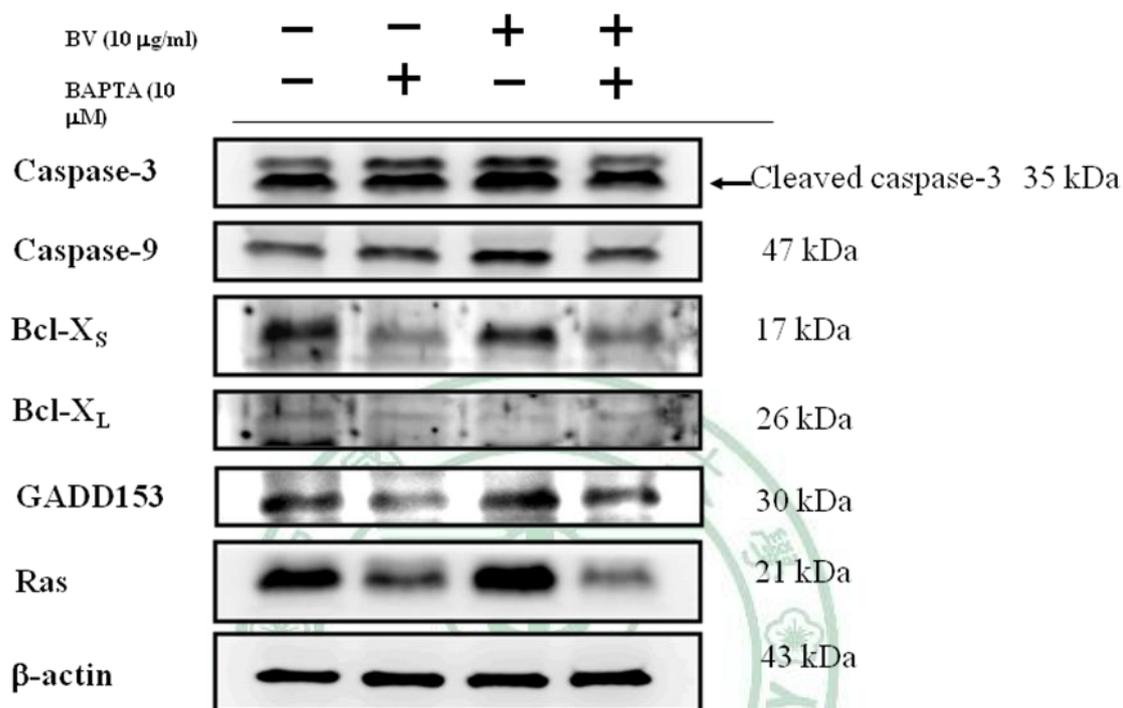


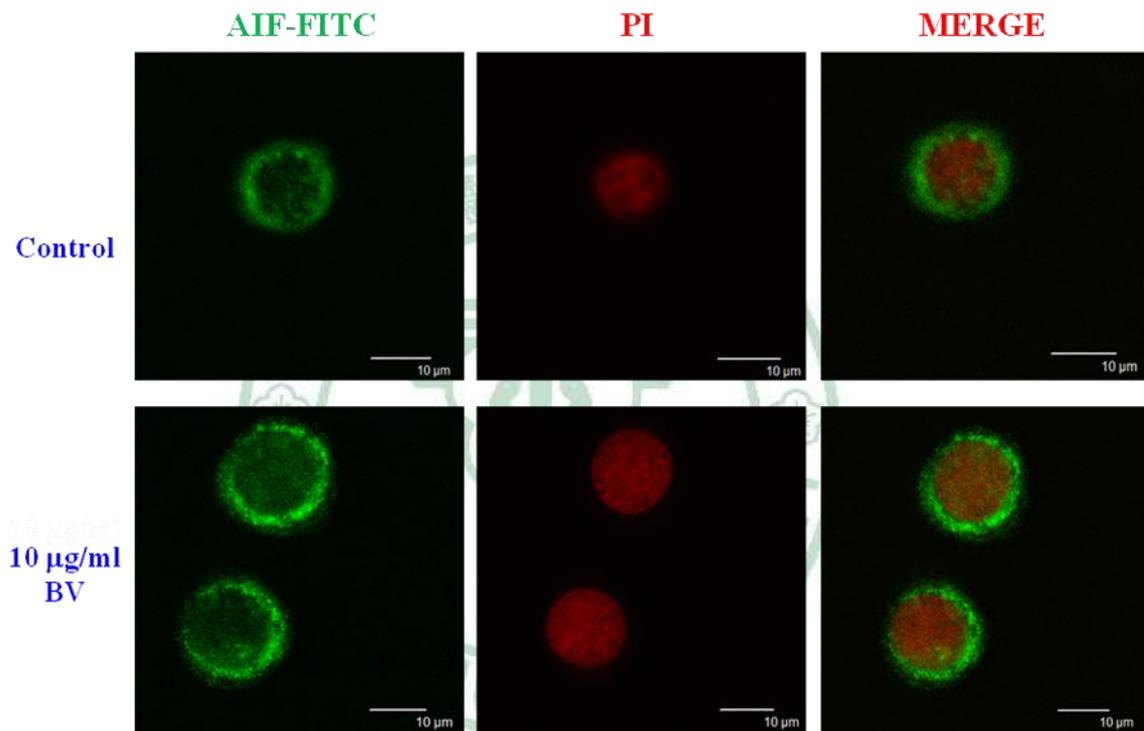
圖 6-20 預處理 BAPTA 3 小時後，以西方墨點法可觀察到明顯抑制了處理蜂肽 10 μ g/ml 之後所誘導的 caspase-3, -9 的裂解，以及 Bcl-X_S、Ras 與 GADD153 的表現量。同時抑制了 Bcl-X_L 抑制 anti-apoptosis 的表現。

第四節、利用免疫螢光染色法探討蜂肽對 TSGH-8301 cells 細胞蛋白

轉位 (translocation) 表現

一、以共軛焦顯微鏡來觀察細胞內 AIF、Endo G、cytochrome *c* 是否有蛋白表現改變與轉位 (translocation) 的情況產生。

(A)



(B)

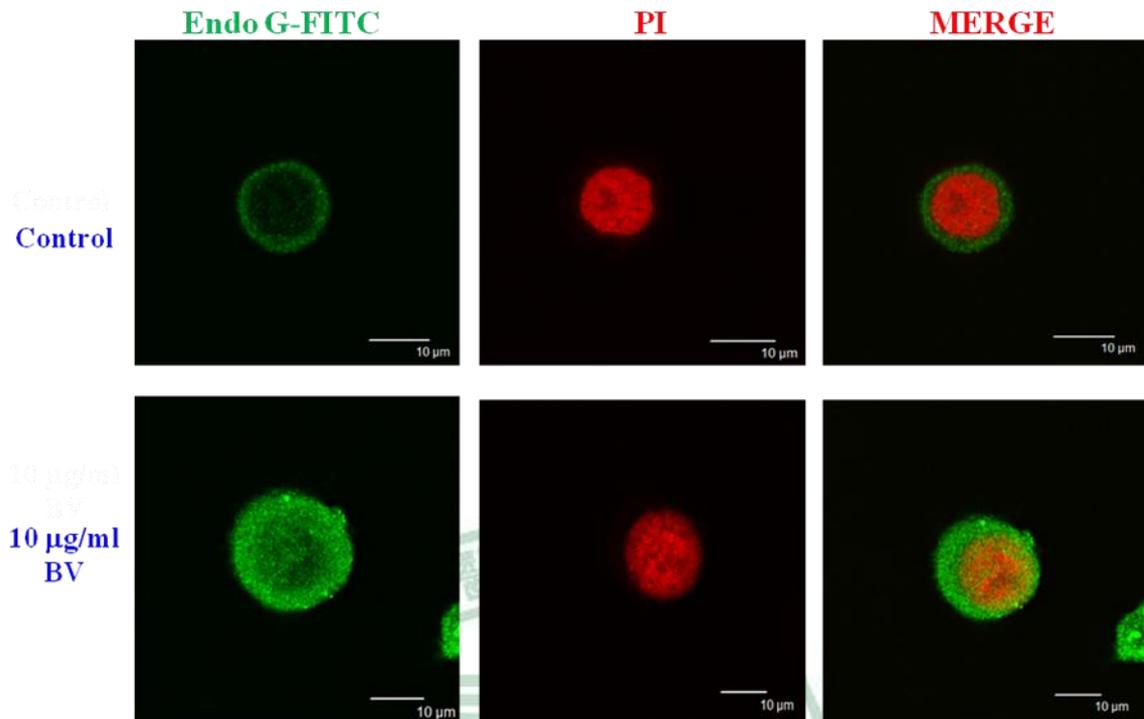


圖 6-21 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞經蜂肽 10 µg/ml 處理後。(A) AIF。(B) Endo G 從粒線體釋出至細胞質，再轉位至細胞核中。一級抗體為 AIF, Endo G。二級抗體標定 FITC 綠色螢光，細胞核染 PI。

二、以共軛焦顯微鏡來觀察 cytochrome *c* 是否從粒線體轉位至細胞質中

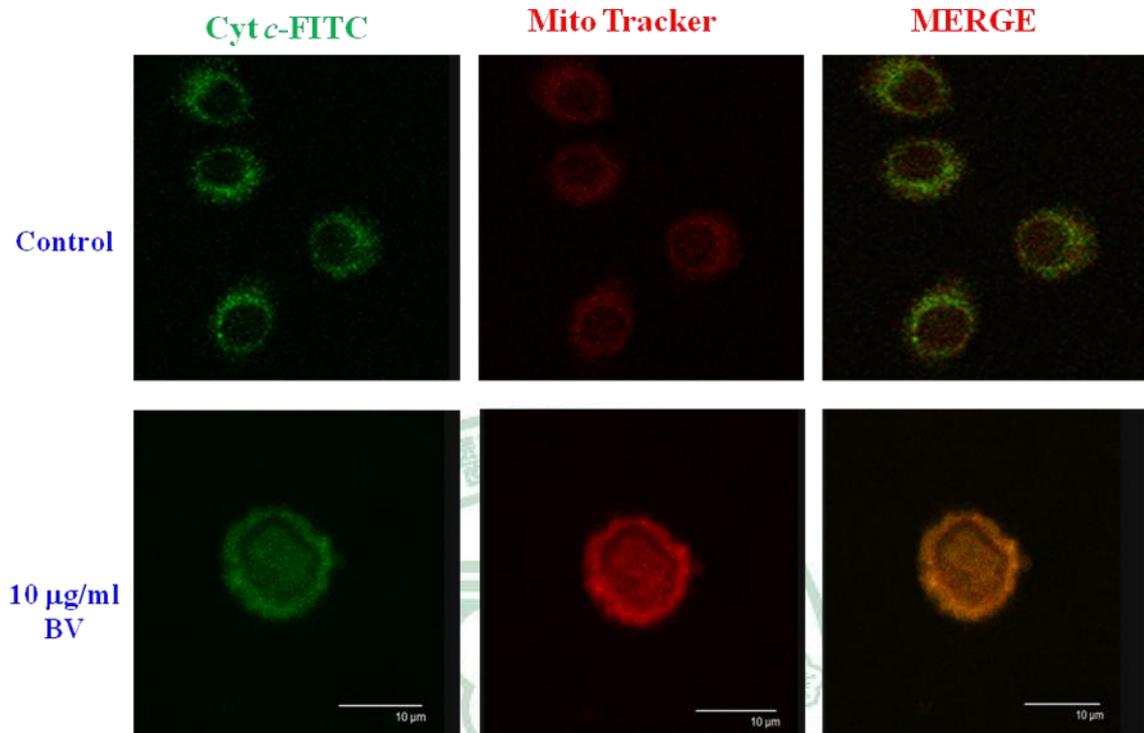


圖 6-22 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞經蜂肽 10 μg/ml 處理後 cytochrome *c* 從粒線體釋出至細胞質的情形。一級抗體為 cytochrome *c*。二級抗體標定 FITC 綠色螢光，粒線體標定 Mito Tracker。

三、預處理 BAPTA 後，以共軛焦顯微鏡觀察對蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 蛋白質轉位情況之影響。

Cytochrome *c* merged with Mito Tracker

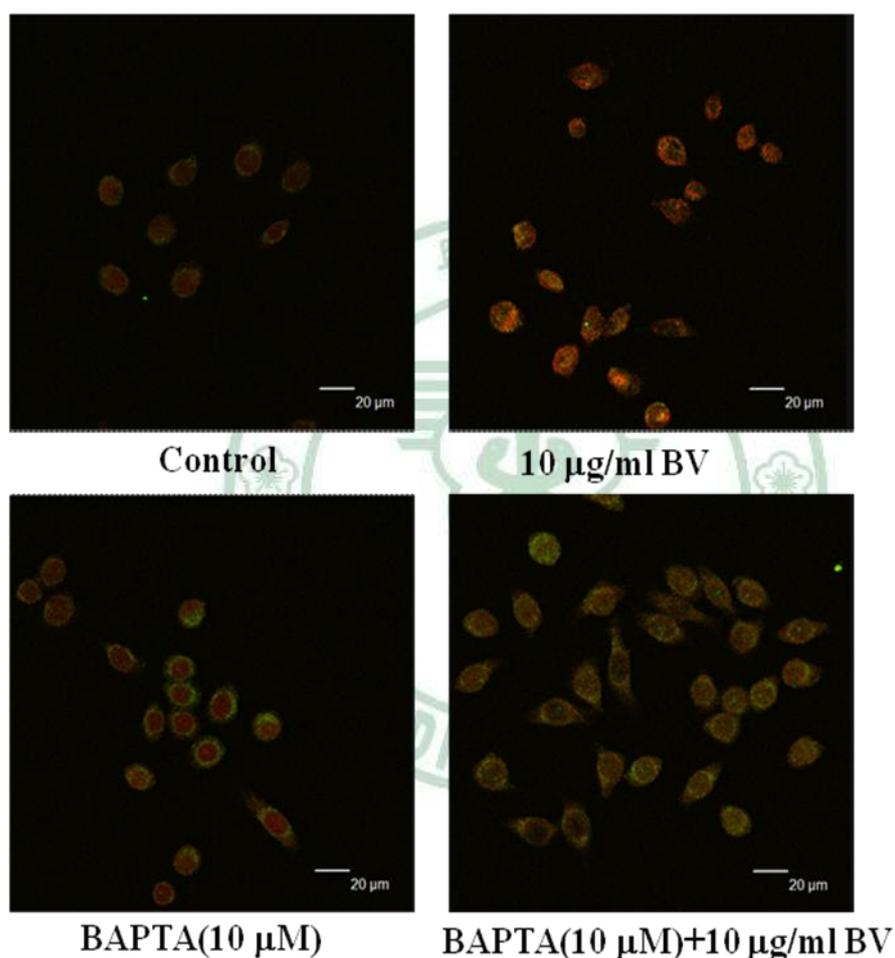


圖 6-23 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞預處理 BAPTA 後，減弱蜂肽 10 µg/ml 處理後蜂肽所誘導之 cytochrome *c* 的螢光強度。一級抗體標定 cytochrome *c*，二級抗體標定 FITC，粒線體標定 Mito Tracker。

Endonuclease G (Endo G)-FITC

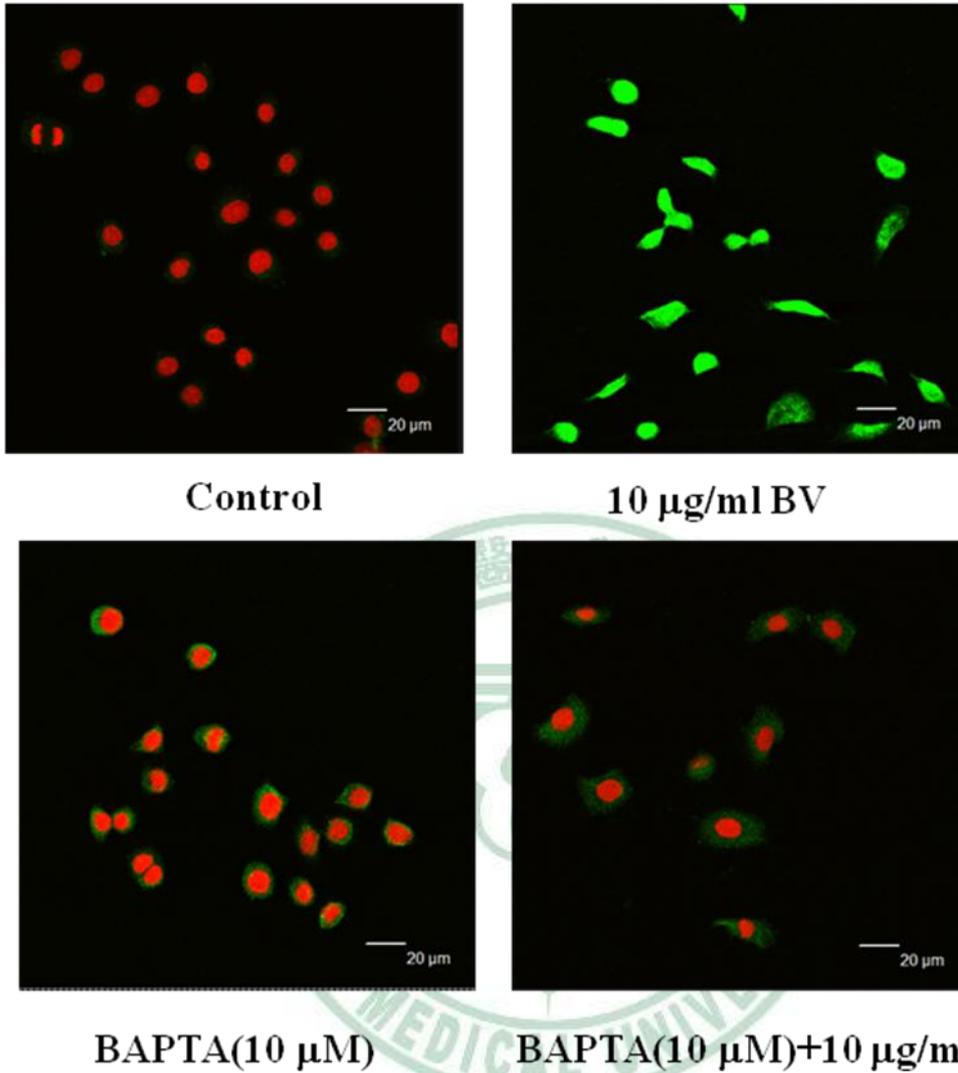


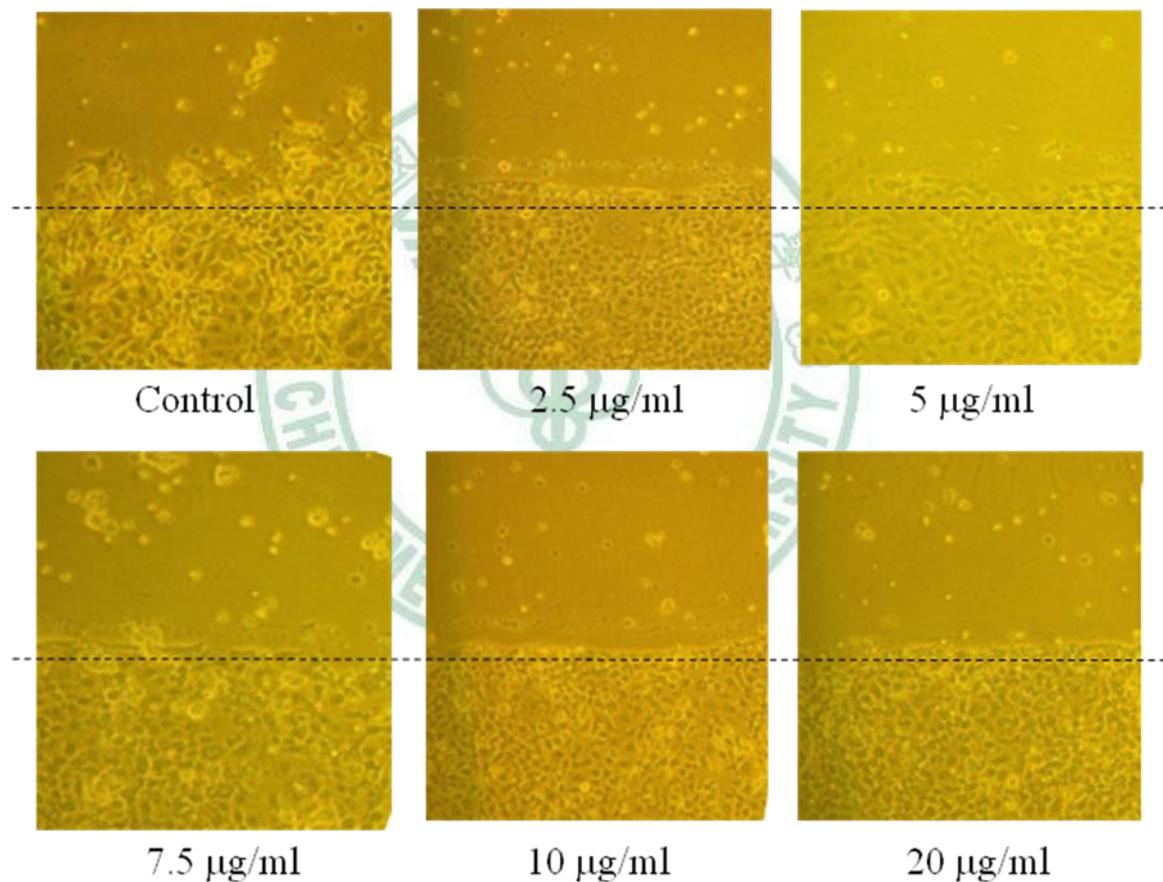
圖 6-24 以共軛焦顯微鏡觀察 TSGH-8301 細胞預處理 BAPTA 會明顯減弱蜂肽 10 µg/ml 誘導之 Endo G 的螢光強度與轉位表現。

第五節、蜂肽(bee venom)對 TSGH-8301 細胞移動(migration)與細胞

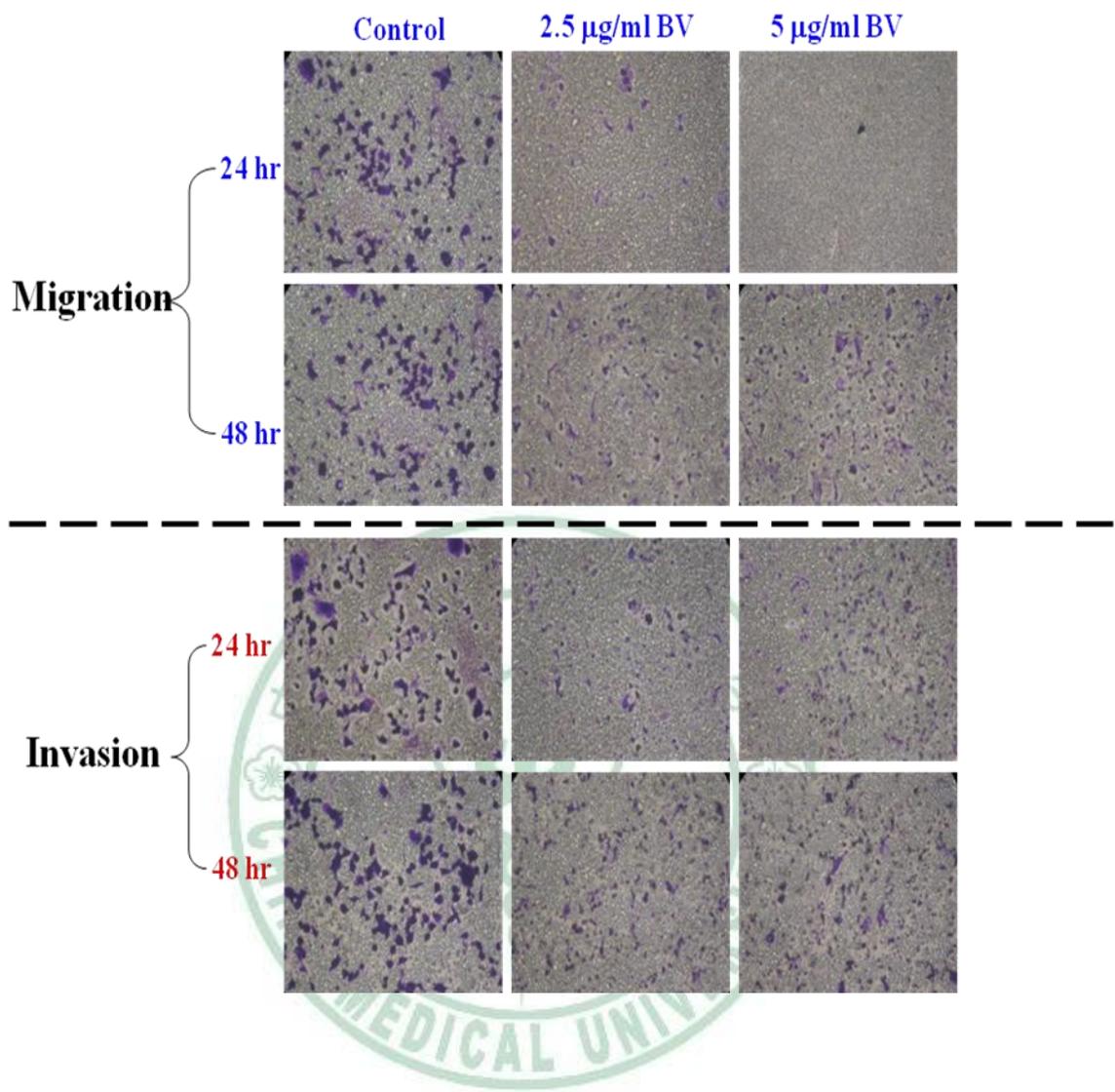
侵襲(invasion)的影響

多項研究指出 TSGH-8301 細胞具有轉移的能力，會擴散至不同器官中⁽¹¹⁾，本實驗想要探討蜂肽是否會抑制 TSGH-8301 細胞移動與侵襲的能力，降低轉移機率。本實驗以 Wound healing assay 以及 invasion, migration assay 來觀察蜂肽是否可以抑制 TSGH-8301 轉移的能力。

(A)



(B)



(C)

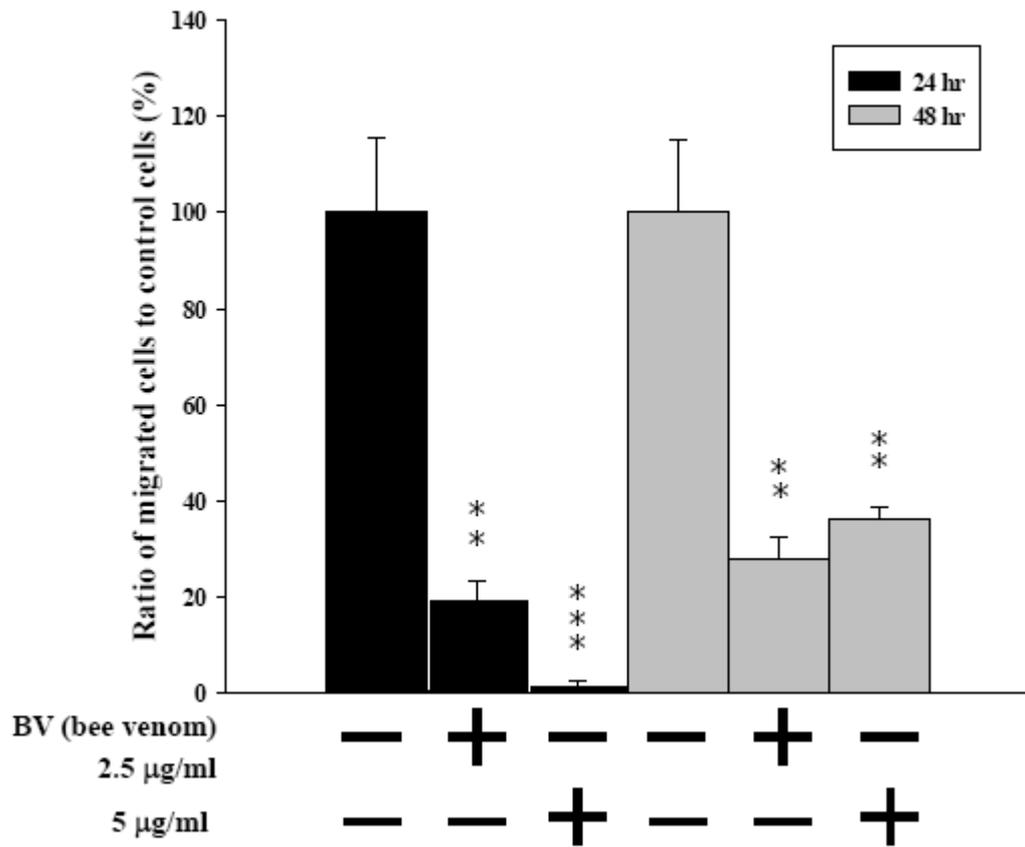
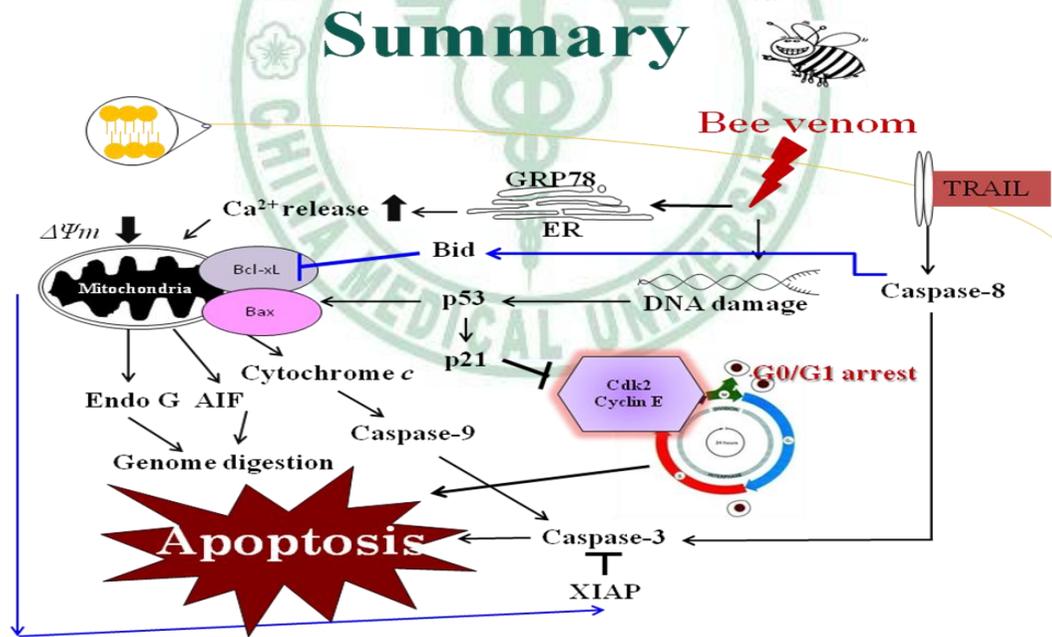


圖 6-25 觀察蜂肽對 TSGH-8301 細胞轉移能力的影響。(A)以 Wound healing assay 可觀察到控制組細胞有向外爬行的現象，其他蜂肽加藥組則很明顯的失去爬行的能力。(B)以 invasion 及 migration assay 來觀察細胞轉移的能力，發現處理蜂肽之後轉移的細胞量很明顯的降低。(C)量化分析轉移細胞量的統計分析圖，*表示以 Student's *t*-test 進行分析實驗組與控制組之間存在之顯著差異， $p < 0.05$ 。

第七章 蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡之機制

本實驗證明，處理蜂肽確實可以造成人類膀胱癌細胞株（TSGH-8301）走向細胞凋亡。根據實驗結果，推測可能是經由蜂肽造成內質網壓力釋出大量鈣離子，造成粒線體膜電位下降，調節 Bcl-2 家族蛋白的表現，釋出 Endo G、AIF 進入細胞核造成細胞染色體分解，以及 cytochrome c 活化 caspase-9 接著活化 caspase-3 誘導細胞凋亡。此外也有可能是造成 DNA 損傷令 p53 向上調節 p21 的活性，因而抑制 cyclin E 複合體的活性，阻礙細胞週期走向 S 期，造成細胞週期停滯在 G0/G1 期。同時也證實了蜂肽可誘導細胞膜上的死亡受器蛋白活化進而與 caspase-8 形成死亡複合體，最後活化 caspase-3，造成細胞走向 apoptosis。



第八章 研究討論

蜂肽 (bee venom)，廣泛流傳於民間的中醫藥研究中，也是世界醫療保健中的一顆明日之星^(50, 113-116)。蜂肽內含許多不同成份的活性複合物，在源遠流長的東方傳統醫學上，常被老祖先們用來治療關節炎，關節疼痛、風濕症、抗血栓、抗病毒、抗發炎.....等病痛治療。近年來，有不少研究腫瘤的學者分別在 *in vivo*, *in vitro* 上研究蜂肽的抗癌能力，探討其分子機制。如：蜂肽對 U937 細胞之影響⁽¹¹⁷⁾，肝癌細胞⁽⁴⁹⁾，黑色素腫瘤細胞 A2058⁽¹¹⁸⁾，子宮頸癌 Ca Ski⁽¹⁰⁰⁾ 皆有抑制癌細胞生長之現象。但對人類膀胱癌細胞株 (TSGH-8301) 誘導產生細胞凋亡的分子機制上無研究報告。故本實驗探討蜂肽是否可誘導 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡、抑制轉移與增生之相關分子機制。

本研究以蜂肽處理人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 cells 作用後，探討在 *in vitro* 模式中蜂肽對 TSGH-8301 cells 之增生、存活率、細胞週期、DNA 傷害、染色體凝集、細胞型態.....等現象之改變情況⁽¹⁰⁰⁾。另外可以從圖 5-1 就可以觀察到不同濃度之蜂肽對 TSGH-8301 cells 隨著時間的增加，細胞數與細胞外觀都有明顯的改變。另外，有文獻指出蜂肽對正常胸主動脈平滑肌細胞 (HUVEC) 的生長抑制並不明顯，但對癌細胞卻會隨著濃度上升而有越趨嚴重的毒殺效果，顯示蜂肽對正常平滑肌細胞並無影響，但對癌細胞的毒殺效果卻隨著濃度增加而效果越明顯⁽¹⁰⁰⁾。

此外，粒線體與細胞凋亡的相關研究越來越多，粒線體從原本已知只有產能的功能，到後來被研究出細胞死亡也與粒線體有密切的關係，粒線體將不再只是單純的粒線體，也跟整個細胞息息相關⁽¹¹⁹⁾。粒線體主要是由磷脂雙層構成其內膜及外膜結構，外膜尚包含許多孔道蛋白，具有可允許離子和小分子通過的通道。而大分子是無法通過外膜的。另外內膜幾乎不含孔道蛋白，通透性也很弱，幾乎所有離子和分子都需要特殊的跨膜轉運蛋白來通過基質。一般而言，當細胞產生凋亡的時候，粒線體內會有一些蛋白釋出 (Bax、AIF....等)⁽¹²⁰⁾，然而調控這

些蛋白的釋出被認為與粒線體膜上一種 MPTP (mitochondrial permeability transition pore) 的巨大通道有關。MPTP 包含兩大部分：1. 粒線體內膜-adenine nucleotide translocator (ANT) 相關之蛋白質；2. 外膜蛋白質- (voltage-dependent anion channel, VDAC)⁽¹²¹⁾。若是打開此通道會造成粒線體內膜兩側氫離子梯度 (H^+ -gradient) 消失、粒線體膜電位下降、粒線體基質滲透壓增高，造成粒線體漲大，外膜漲破後⁽¹²²⁾，會釋出一些與細胞凋亡相關的蛋白 (cytochrome c 和 AIF.... 等)，造成細胞 apoptosis。

一般來說細胞週期分為 G0/G1、S、G2、M 四期，因為 G0/G1 期的染色體為單套，S 期主司合成與複製 DNA，而 G2/M 期的染色體為雙套，另外 Sub-G1 期則是細胞要進入凋亡的前期，受到內切酵素 (endonucleases) 作用，故細胞中的 DNA 不成對，我們以流式細胞儀來分析。故 Sub-G1 期在流式細胞儀分析上分布於 G0/G1 的前期。可以從圖 5-4 可以得知，隨著蜂肽濃度越來越高，在蜂肽作用 24 小時後 TSGH-8301 cells 的細胞週期分佈在 G0/G1 期的百分比越來越多，Sub-G1 期的百分比也越來越高，表示細胞凋亡的程度越來越明顯且細胞週期停滯在 G0/G1 期。在 2007 年 Moon 等人以蜂肽處理對 U937 細胞週期之影響⁽¹¹⁷⁾

另外還以彗星試驗及 DAPI 染色法來觀察蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 發生 DNA damage 之現象。彗星試驗是一種單細胞電泳法，利用電泳將細胞中的 DNA 帶出細胞外，若是細胞有 DNA damage，則可以在顯微鏡底下發現有 DNA 拖尾的現象發生⁽¹²³⁾。在本實驗的圖 5-5 中可以觀察到經蜂肽處理 24 小時後的 TSGH-8301 cells，隨著蜂肽濃度的上升，細胞拖尾的現象漸趨明顯。另外以 DAPI 染色觀察 DNA damage 程度⁽⁶¹⁾，隨著 DNA damage 程度的上升，DAPI 的螢光亮度會越來越強。從圖 5-6 可以觀察到，經蜂肽處理 24 小時後的 TSGH-8301 cells，隨著蜂肽濃度的上升，DAPI 螢光強度越來越強，表示 DNA damage 越來越嚴重，而且細胞數也越來越少，顯示蜂肽確實誘導 TSGH-8301 cells 產生 DNA damage。我們還利用 DNA 膠體電泳法 (agrose gel electrophoresis) 觀察蜂肽是否會造成 TSGH-8301 cells 產生 DNA fragmentation 現象。當細胞走向細胞凋亡時，DNA

會產生片段化的現象，產生大約 180~250 bps 的 DNA 小片段⁽¹²⁴⁾。我們可以觀察到經蜂肽 7.5、10 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後的 TSGH-8301 cells 有 DNA ladder 的現象產生。證實蜂肽確實造成 TSGH-8301 cells 的 DNA 破壞與細胞凋亡。

接下來本實驗以流式細胞儀偵測 PhiPhiLux kit 之 caspase-3 的活性，CaspaLux kit 檢測 caspase-8, -9 的活性。國內外也有許多相關研究指出 caspase 家族蛋白與細胞凋亡有直接或間接的影響⁽¹²⁵⁾。由圖 5-8, 9, 10 可以得知給予蜂肽 10 $\mu\text{g/ml}$ 處理 TSGH-8301 cells 之後，發現 caspase-3 的活性在 24 小時之後才明顯上升，而 caspase-8 在 6 小時就有明顯的上升，caspase-9 的活性則在 12 小時才明顯上升。這顯示 caspase-8, 9 的活性是在比較短的時間就上升，而 caspase-3 的活性比較晚上升，表示 caspase-3 的活性有可能是被 caspase-8, 9 裂解所活化的，且蜂肽確實造成 TSGH-8301 cells 走向 apoptosis。

由流式細胞儀分析得知蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 細胞週期停滯在 G0/G1 期。然而細胞週期受到許多相關分子調控包括 Ca^{2+} 、Cyclins/cdks、p53、pRb 及 E2F、p21、ATM、CDC25 等因子。本實驗主要想要看檢測 G0/G1 期要進入 S 期這中間的相關蛋白，如：Cyclin D-CDK4/6 complex 及 Cyclin E-CDK2 complex、p21、p-p53、chk2。Cdk 必須和 cyclin 結合成 complex 才具有活性化下游基因，由圖 5-11 可得知 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽會造成 Cyclin D-CDK4/6 complex 及 Cyclin E-CDK2 complex 活性下降，而使細胞週期停滯在 G0/G1 期。而 chk2 會抑制 Cyclin D-CDK4/6 complex 或 Cyclin E-CDK2 complex 的活性，本實驗也指出 chk2 的活性的確在 48 小時明顯上升。當 DNA damage 時會刺激增加 p53 的活性表現，p53 是一種腫瘤抑制者及轉錄因子可以調節細胞內幾個主要功能如：細胞週期的調控、基因的轉譯、DNA 合成與修復、及細胞死亡等⁽¹²⁶⁾。而 p53 被 DNA damage 活化後，會接上 p21 的 promoter，活化 p21 的活性，p21 活化之後會抑制 Cyclin D-CDK4/6 complex 的活性，可能會造成細胞週期停滯⁽¹²⁷⁾。在本實驗的圖 5-11 也可以很明顯的看出 10 $\mu\text{g/ml}$ 蜂肽會在 48 小時使 p-p53 與 p21 的活性明顯的上升。綜合以上 G0/G1 期相關蛋白的實驗結果，本實驗可以很確定蜂肽確實造

成 TSGH-8301 cells 細胞週期停滯在 G0/G1 期。

有研究指出內質網釋出的鈣離子會影響粒線體的功能與細胞存活⁽¹²⁸⁾。內質網主要的功能是幫助蛋白質摺疊成正常的結構與分泌蛋白質，但若內質網受到外力影響造成內質網壓力，則會讓許多蛋白質摺疊失敗或失去功能，細胞內蛋白質失去功能，細胞也就逐漸邁向自我吞噬或死亡。一般來說細胞內的氧化還原的調節作用失衡可能產生一些氧化或還原物質堆積在內質網腔，進而造成蛋白質的未折疊或錯誤摺疊，另外葡萄糖的缺乏也可能會造成內質網壓力，因為會干擾ER上的N-連結蛋白的糖化作用，也可能是因ER上的鈣離子調節者 (GRP78、GRP94、calreticulin)的變化造成蛋白質的錯誤摺疊，產生了UPR (unfolded protein response)⁽⁷⁷⁾。正常的GRP78蛋白這類葡萄糖調節性伴護質會連接在位於內質網腔中的IRE1 α 、PERK、ATF6 α 這些蛋白質的尾端，以免他們活化。而內質網上的未折疊蛋白則會另GRP78釋出這些蛋白質，釋放時IRE1 α 、PERK會以寡體 (oligomerize)存在內質網上，而寡體的IRE1 α 會結合TNF receptor associated factor 2 (TRAF2)，活化apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)以及其下游的p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) and Jun N-terminal kinase (JNK)。此外IRE1 α 內在的核糖體解酶會活化XBP-1 (X-box-binding protein 1)的產生，XBP1是一種會修補未折疊蛋白或降解蛋白質的轉錄因子；寡體化的PERK會活化eukaryotic translation initiation factor 2 α (EIF2 α)且抑制全面性的mRNA的轉譯作用。而ATF6 α 的釋出則會使這些蛋白轉位至高基氏體上去執行蛋白質分解作用且幫助活化態的ATF6 α 釋出來調控UPR與ER-assisted degradation (ERAD)的基因表現⁽⁸⁴⁾。以上為UPR可能造成細胞死亡的相關路徑。可以從圖5-12觀察得知，PERK在蜂肽處理後24、48小時有大量表現的現象；ATF-6 α / β 、HIF-1 α 皆在12小時表現量上升；而XBP1與caspase-4皆在48小時有明顯表現，另外鈣離子訊息路徑相關蛋白GRP78與GADD153也明顯的表現量上升。以上這些蛋白皆指出蜂肽確實造成TSGH-8301 cells產生內質網壓力，影響鈣離子濃度，導致ER-stress-induced apoptosis的發生⁽¹²⁹⁾。

內質網產生壓力之後會活化 GRP78，進而釋出鈣離子，細胞內鈣離子濃度短時間內提升許多，造成粒線體不穩定，VDAC 蛋白過度表現，粒線體內鈣離子堆積，產生 cytochrome *c*、Bid、Bax 等蛋白造成細胞凋亡⁽¹³⁰⁾。細胞凋亡路徑主要有 2 種---內在路徑 (mitochondrial pathway) 及外在路徑-死亡受器路徑 (death-receptor pathway)。又稱為粒線體路徑，可經由粒線體功能不良或粒線體釋放凋亡蛋白活化。粒線體路徑又分為兩種路徑，一種是 caspase 相關路徑，此路徑受到 Bcl-2 protein family 調控，pro-apoptotic protein---Bax/Bak 會影響粒線體膜電位，釋放出 cytochrome *c* 會活化 caspase-9，進一步活化 caspase-3，誘導細胞凋亡⁽¹³¹⁾；Anti-apoptotic protein---Bcl-2、Bcl-X_L、cIAPs 會抑制細胞凋亡^(132, 133)。由圖 5-13 可以觀察到以蜂肽 10⁴ μg/ml 處理不同時間後的 TSGH-8301 cells 的粒線體相關蛋白表現量。結果顯示蜂肽可以活化 Bax 蛋白，影響 Bid 的表現，提升 Bcl-X_S 的活性，抑制 Bcl-X_L 的表現，活化圖 5-15 中 caspase-9, 3 的活性，造成細胞凋亡。另外一種路徑是 caspase-independent pathway，不經過活化 caspase 蛋白就可以誘導細胞死亡。如：apoptosis-inducing factor (AIF)、Endonuclease G (Endo G)。Apoptosis-inducing factor (AIF) 會受到一些凋亡基因刺激後蛋白表現量會上升且會從粒線體內膜釋放到細胞質中，進而轉入細胞核內⁽¹³⁴⁾。從圖 5-13 本實驗可以觀察到蜂肽確實可令 TSGH-8301 cells 的 AIF、Endo G 表現量上升。至於轉位入細胞核的檢驗，從圖 5-21 可以觀察到以免疫螢光染色的 AIF、Endo G 蛋白質在細胞內的分布情形，從共軛焦顯微鏡上可以明顯的觀察到蜂肽可以誘導 TSGH-8301 cells 的 AIF、Endo G 從粒線體釋出至細胞質中，再轉位入細胞核中，造成細胞基因體的降解。

外在路徑又稱為死亡受器路徑，目前已知的死亡受器有六種，表 2-2-2 有分類。Fas 是一種位於細胞表面的醣基化蛋白，屬於 TNF receptor superfamily 中 type I 膜蛋白；FasL 是屬於 type II 膜蛋白。當 FasL 結合至 Fas 會活化 Fas receptor，並吸引 FADD (Fas-associated death domain；FADD) 結合至 receptor 位於細胞質中的 domain。FADD 含有 death effector domain 會影響到 initiator caspase

(caspase-8、caspase-10)，使 procaspase-8 活化成具活性 caspase-8，此複合物稱為 death-inducing signaling complex (DISC)⁽⁷⁶⁾。DISC 活化之後會分成兩條路徑，一條是活化 caspase-8，再裂解 caspase-3，最後造成細胞凋亡；另一條是 caspase-8 會活化 Bid 形成 tBid，tBid 會轉位至粒線體膜上造成粒線體功能失調，再走回內在路徑誘導細胞凋亡。從圖 5-14 可以觀察到 Fas、FasL 在 24 小時皆有表現上升的情況，TRAIL 則隨著蜂肽處理時間越長而表現越來越明顯，活化態的 caspase-8 也在 48 小時也顯著的表現。IAP (inhibitor of apoptosis proteins) 家族的 XIAP 也隨著蜂肽處理時間越長而被抑制了表現。以上研究證實了蜂肽的確經由粒線體與外在路徑誘導 TSGH-8301 cells 邁向 apoptosis。

內質網與粒線體之間有無形的鈣離子流，也就是當 ER stress 產生而釋出大量的鈣離子，這次游離在細胞質的鈣離子會令粒線體膜電位改變，粒線體於是將大量的鈣離子經離子通道交換入粒線體內，以降低細胞內鈣離子濃度⁽⁶⁸⁾。由本實驗結果證實蜂肽的確是經由 ER stress 與粒線體路徑造成 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡，接下來要更深入的探討內質網與粒線體之間是否是經由鈣離子濃度的改變當作一種訊息傳遞，以及蜂肽是否確實經由內質網釋出大量鈣離子，再影響粒線體膜電位，改變粒線體中各項蛋白的功能。由圖 5-16 本實驗以鈣離子螢光染劑 (Fluo-3/AM) 與流式細胞儀來偵測細胞內的鈣離子濃度，發現處理蜂肽 10 μ g/ml 處理 TSGH-8301 cells 之後 1、3 小時皆有明顯的鈣離子上升現象發生。這表示內質網的鈣離子的確在短時間內大量釋出，但是接下來的 12、24 小時鈣離子濃度又回降與控制組差不多的濃度，這表示一定有某樣東西在調控細胞內的鈣離子濃度。根據文獻研究很有可能是粒線體降低了鈣離子濃度，但是由本實驗還不能武斷認定蜂肽誘導 TSGH-8301 cells 細胞凋亡就是經由內質網釋出的鈣離子流改變粒線體膜電位之凋亡路徑。在圖 5-17 我們預處理 BAPTA，它是一種鈣離子螯合劑，擁有比 EDTA 更強的抓住細胞內鈣離子的能力。我們一樣以鈣離子螢光染劑 (Fluo-3/AM) 染細胞內鈣離子，然後以共軛焦顯微鏡與流式細胞儀相同的氬 488 nm 雷射激發光去激發 Fluo-3/AM 螢光染劑產生類似 FITC 的綠色螢光，

以此綠色螢光強度來量化細胞內鈣離子濃度差⁽¹¹²⁾。圖 5-17 可以由鈣離子螢光強度觀察到預處理 3 小時 BAPTA 10 μ M 很明顯的抑制了蜂肽所誘導 TSGH-8301 cells 大量釋出的鈣離子。另外有文獻指出鈣離子訊息傳導能調控細胞增生與死亡⁽¹³⁵⁾。本實驗欲探討鈣離子是否能調控蜂肽所誘導 TSGH-8301 cells 的細胞死亡，本實驗預處理 3 小時 BAPTA 10 μ M，發現確實減少蜂肽所造成的細胞死亡，證明了蜂肽確實經由鈣離子訊息路徑來調控 TSGH-8301 cells 的生與死。此外，本實驗還想要探討鈣離子濃度的改變是否能影響粒線體膜電位，改變細胞的生理機制。本實驗預處理 3 小時 BAPTA 10 μ M 發現的確明顯抑制蜂肽所誘導 TSGH-8301 cells 粒線體膜電位下降的程度。以上又再一次證明蜂肽的確是經由鈣離子訊息來調控 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡。

由以上實驗證實鈣離子確實能影響粒線體的功能，接下來當然想探討鈣離子是否也會影響粒線體相關蛋白的表現。由圖 5-20 可以觀察到預處理 BAPTA 10 μ M 顯著的減少了蜂肽所活化的 caspase-3, -9 的活性，證明鈣離子濃度的改變確實能改變 caspase 凋亡路徑。另外也觀察到預處理 BAPTA 能顯著的抑制 Bcl-X_S 的表現，增強 Bcl-X_L 蛋白的抗凋亡能力，這證明了鈣離子的改變確實能影響粒線體功能的正常與否。有文獻指出，Ras 調控細胞增生、分化及凋亡等路徑途徑可能與鈣離子濃度有關⁽¹³⁶⁾，Ras 是經由和 GTP 或 GDP 結合調節其活性，當 Ras 和 GDP 結合會使 Ras 失去活性；若和 GTP 結合會活化 Ras 而影響到下游路徑表現如：MAPK pathway。MAPK signaling pathways 主要分為 3 種：ERK、JNK 及 p38 MAPK，由圖 5-20 可以觀察到鈣離子確實能改變蜂肽所誘導 TSGH-8301 cells 的 Ras 蛋白表現。當 ER stress 產生時，鈣離子從內質網釋出，UPR 產生，GADD153 (CHOP) 與 GRP78 這類鈣離子相關蛋白表現上升，有文獻指出鈣離子也會影響內質網的正常功能⁽¹³⁷⁾，從圖 5-20 可以觀察到蜂肽所誘發 GADD153 活性上升被 BAPTA 所抑制住，但是否就能代表鈣離子濃度被抑制可以減少 UPR 產生，還需要更多研究來證實。有研究指出 AIF 的活化可以被細胞內鈣離子升高所誘導⁽⁷⁴⁾，於是本實驗亦探討了鈣離子濃度變化是否會影響粒線體的凋亡相關路

徑，以共軛焦顯微鏡來觀察 Endo G, cytochrome *c* 是否會被鈣離子影響其從粒線體釋出的能力。由圖 5-23 可以觀察到預處理 BAPTA 確實能減弱 cytochrome *c* 從粒線體釋出至細胞質的表現量，證實了鈣離子確實能影響蜂肽所誘發 TSGH-8301 cells 之內在凋亡路徑相關蛋白的表現。此外由圖 5-24 本實驗發現，預處理 BAPTA 強力的減弱 Endo G 從粒線體釋出至細胞質中，同時也減弱了 Endo G 轉位入細胞核的能力，證明了鈣離子的確會改變蜂肽所誘發 TSGH-8301 cells 之 caspase-independent apoptotic pathway。

許多研究指出癌細胞發展至一定程度會發生轉移 (metastasis) 的現象，癌細胞會到處爬行、侵襲、移動，轉移至其他組織器官，造成全身性器官突變、衰竭⁽¹³⁸⁾。圖 5-26 可以觀察得知蜂肽的確顯著降低 TSGH-8301 cells 的爬行、入侵與侵襲能力。



第九章 實驗結論

由以上結果得知，蜂肽誘導人類膀胱癌細胞株 TSGH-8301 走向細胞凋亡可能經由多種途徑，例如：外在路徑、內在路徑、內質網鈣離子途徑、Caspase-dependent pathway。我們可以觀察到蜂肽誘導產生內質網釋出鈣離子啟動了粒線體凋亡路徑，導致粒線體膜電位下降且釋出許多 pro-apoptotic 蛋白 ex:Bax、Bcl-X_s、Bid 與 cytochrome *c*，cytochrome *c* 接著活化 caspase-9，再裂解 caspase-3，caspase-3 抑制住可以修復 DNA 的 PARP 活性，走向 Caspase-dependent apoptosis pathway；此外粒線體同時釋出 AIF、Endo G 至細胞質再轉位入細胞核中，造成 DNA 的降解，走向了 Caspase-independent apoptotic pathway。

我們以 DAPI，Comet assay，DNA fragmentation 觀察到蜂肽確實造成 TSGH-8301 細胞 DNA 傷害，引起 p53 蛋白表現上升且提高了 p21 的活性，p21 抑制了 Cyclin D/Cdk4, 6、Cyclin E/Cdk2 的表現，造成 TSGH-8301 無法往下一個細胞週期進行，停滯在 G0/G1 期。

另外我們可以觀察到內質網中的一些 unfolding protein (PERK、IRE-1、ATF-6) 的表現量確實上升，表示蜂肽確實造成 TSGH-8301 細胞產生 ER stress，UPR 的發生，unfolding protein 大量累積在內質網上。而內質網上鈣離子釋出相關蛋白 (GRP78、GADD153) 表現量明顯被蜂肽所誘發而提高。證明了蜂肽確實是經由內質網鈣離子釋出造成 TSGH-8301 細胞走向死亡。

外在路徑方面，我們從西方墨點法可以觀察到許多死亡受器 (TRAIL、Fas、FasL) 與 caspase-8 的蛋白表現量都被蜂肽誘導而提升了。顯示蜂肽也能經由外在路徑造成細胞死亡。

最後許多癌細胞研究皆指出，癌細胞容易有轉移的現象產生，於是我們想探討蜂肽除了誘導 TSGH-8301 細胞走向細胞凋亡之外，是否也能抑制 TSGH-8301 細胞的轉移能力。從 Wound healing assay，invasion 及 migration assay 可以觀察到蜂肽確實能抑制 TSGH-8301 細胞轉移能力。

蜂肽是一個歷史相當悠久的天然藥物，廣泛的被用來治療風濕、關節炎等疾病。在蜂肽與癌症這塊領域上，本研究不僅證實蜂肽可以經由粒線體凋亡路徑、caspase 依賴性凋亡路徑與 caspase 依賴性凋亡路徑、內質網釋出大量鈣離子訊息等不同途徑誘導 TSGH-8301 cells 走向細胞凋亡，更證明蜂肽可以抑制癌細胞的生長與轉移，本實驗期許能為癌症天然藥物開發這塊領域盡棉薄之力，希望蜂肽 (bee venom) 有一天也能造福更多癌症病患。



第十章 參考文獻：

- [1] 行政院衛生署. 國人 95 年癌症死因排名. 2006.
- [2] 陶聲洋防癌基金會. 2008.
- [3] Muller, U., Helbling, A., Berchtold, E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89(2): 529-535.
- [4] 李萬瑤. 蜂針療法. 2003.
- [5] 行政院衛生署. 國人 95 年癌症死因排名. 2007.
- [6] Ou, T. T., Wang, C. J., Hung, G. U., Wu, C. H., Lee, H. J. Aqueous Extract of Shi-Liu-Wei-Liu-Qi-Yin Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Bladder Carcinoma Cells via Fas and Mitochondrial Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009.
- [7] 台中榮總泌尿科. 2007.
- [8] Yu, D. S., Yeh, M. Y., Chang, S. Y., Ma, C. P., Han, S. H. Immunotherapy of xenografted human bladder cancer in nude mice using monoclonal antibody. *Eur Urol* 1987; 13(3): 198-202.
- [9] Yeh, M. Y., Yu, D. S., Chang, S. Y., Ma, C. P., Han, S. H. Radioimmunotherapy of xenografted human bladder cancer using monoclonal antibody against blood group A-related antigen. *Eur Urol* 1988; 14(5): 386-390.
- [10] Chang, F. L., Ling, Y. F., Lai, M. D. Exogenous mutant p53 DNA enhanced cisplatin-induced apoptosis in TSGH-8301 human bladder cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20(1A): 329-336.
- [11] Peng, C. C., Chen, K. C., Peng, R. Y., Chyau, C. C., Su, C. H., Hsieh-Li, H. M. *Antrodia camphorata* extract induces replicative senescence in superficial TCC, and inhibits the absolute migration capability in invasive bladder carcinoma cells. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(1): 93-103.
- [12] Katz, M. H., Steinberg, G. D. Should fluorescence cystoscopy be used for transurethral resection in patients with high-grade T1 bladder cancer? *Nat Clin Pract Urol* 2008; 5(9): 472-473.
- [13] Fuzery, A. K., Tonelli, M., Ta, D. T., Cornilescu, G., Vickery, L. E., Markley, J. L. Solution structure of the iron-sulfur cluster cochaperone HscB and its binding surface for the iron-sulfur assembly scaffold protein IscU. *Biochemistry* 2008; 47(36): 9394-9404.
- [14] 陳銳深. 現代中醫腫瘤學. 2003.
- [15] Munaron, L. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1(1): 105-119.
- [16] 李佩文. 中西醫臨床腫瘤學. 1996.

- [17] 方藥中. 實用中醫內科學. 1985.
- [18] 張代釗. 中西醫結合治療放化療之副作用. 2000.
- [19] 張宗歧. 臨床腫瘤綜合治療大全. 1995.
- [20] 鄭秀龍. 腫瘤放射治療增敏藥物的研究與應用. 1990.
- [21] Trivedi, V., Boire, A., Tchernychev, B., Kaneider, N. C., Leger, A. J., O'Callaghan, K., Covic, L., Kuliopulos, A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell* 2009; 137(2): 332-343.
- [22] 駱和生. 免疫中藥學中藥免疫藥理與臨床. 北京醫科大學中國協和醫科大學聯合出版社 1999.
- [23] Wilson, E. O. *Apis mellifera: Honeybee Ecology*. *Science* 1986; 231(4738): 625-626.
- [24] Barker, R. J., Berdel, R. L., Waller, G. D. The molecular basis for scent discrimination: response to nitrobenzene-d 5 of honey bees (*Apis mellifera* L.) conditioned with nitrobenzene. *Experientia* 1973; 29(4): 418-419.
- [25] 李萬遙, 陳., 林國華, 蜂針療法, 2003.
- [26] 李萬瑤, 賴秀麗, 賴先娥. 蜂針. *蜜蜂雜誌* 1998; 6(4).
- [27] 劉艷荷, 陳., 張傳溪. 蜂毒溶血肽的研究進展. *昆蟲知識* 2001; 38(6): 410.
- [28] 劉聞清. 蜂毒治療慢性 B 型肝炎與肝硬化. *中西醫結合雜誌* 1993; 3.
- [29] 張占英. 蜂毒所導致急性腎衰竭. *中醫腎臟病雜誌* 1987.
- [30] 劉秀榮. 蜂螫治療類風性關節炎的甲壁微循環影響. *中國康復醫學雜誌* 1993.
- [31] 游育紅. 蜂肽對豚鼠心肌細胞內游離鈣離子濃度的影響. *福建醫科大學學報* 1997.
- [32] 徐濟良. 蜂毒肽對大鼠主動脈收縮的作用與鈣離子流的關係. *中國動脈硬化雜誌* 1999.
- [33] Koch, G., Habermann, B., Mohr, C., Just, I., Aktories, K. ADP-ribosylation of rho proteins is inhibited by melittin, mast cell degranulating peptide and compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 1992; 226(1): 87-91.
- [34] 劉自元, 孟., 吳國屏. 蜂毒有效成分分離及抗血栓作用之研究. *中國生化藥物雜誌* 1998.
- [35] 呂欣然. 蜂肽對大鼠纖維溶血系統之初探討. *基礎醫學與臨床* 1994.
- [36] 游育紅. 蜂肽對大鼠血小版內鈣離子濃度之影響. *福建醫學院學報* 1995.
- [37] 任蘊芳. 蜂肽對人類肝癌細胞及 LAK 細胞的影響. *基礎醫學與臨床* 1994.
- [38] Mousli, M., Bueb, J. L., Rouot, B., Landry, Y., Bronner, C. G-proteins as targets for non-immunological histamine releasers. *Agents Actions* 1991; 33(1-2): 81-83.
- [39] 王秋波. 蜂毒的免疫調節機制研究. *中醫中藥與免疫* 2000.
- [40] 李紹祥. 蜂毒的研究新進展. *中草藥* 2001.

- [41] 辛紹祥. 蜂毒對大鼠試驗性肝纖維化的療效觀察. 中華肝病雜誌 2001.
- [42] 劉聞清. 蜂毒治療慢性 B 肝與肝硬化. 中西醫結合雜誌 1993.
- [43] 黃申. 蜂毒對大鼠血壓和腦內啡的影響. 中草藥 1986.
- [44] 羅層. 大鼠後肢足底皮下注射蜂毒誘導的脊髓內 c-fos 表現. 神經解剖學雜誌 1998.
- [45] 張波. 蜂毒的藥理作用及應用. 中國療養醫學 2001.
- [46] Habermann. Toxiom 1975.
- [47] 李亞非. 純化蜂肽對免疫性關節炎的抑制作用. 中華風濕病學雜誌 2000.
- [48] Knepel, W., Gerhards, C. Stimulation by melittin of adrenocorticotropin and beta-endorphin release from rat adenohypophysis in vitro. Prostaglandins 1987; 33(3): 479-490.
- [49] Wang, C., Chen, T., Zhang, N., Yang, M., Li, B., Lu, X., Cao, X., Ling, C. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IkappaBalpha kinase-NFkappaB. J Biol Chem 2009; 284(6): 3804-3813.
- [50] Ghabili, K., Shoja, M. M., Parvizi, M. Bee venom therapy: A probable etiology of aneurysm formation in aorta. Med Hypotheses 2009.
- [51] Kubo, H., Loegering, D. A., Adolphson, C. R., Gleich, G. J. Cytotoxic properties of eosinophil granule major basic protein for tumor cells. Int Arch Allergy Immunol 1999; 118(2-4): 426-428.
- [52] 王天宇. 蜂毒的抗輻射作用和染色體畸變的關係. 中華放射線醫學與防護雜誌 1981.
- [53] Bhattacharjya, S., Venkatraman, J., Kumar, A., Balaram, P. Fluoroalcohols as structure modifiers in peptides and proteins: hexafluoroacetone hydrate stabilizes a helical conformation of melittin at low pH. J Pept Res 1999; 54(2): 100-111.
- [54] 丁志賢. 蜂毒在神經系統的研究與應答. 蜜蜂雜誌 1999.
- [55] 嚴序炳. 蜂毒注射液對類風濕性關節炎 86 名患者的影響. 中西醫結合雜誌 1995.
- [56] 徐杰. 雲南中醫藥雜誌 1999.
- [57] 管尊惠. 蜂毒注射液與直電流至療麻痺症患者之影響. 中國針灸 2000.
- [58] 朱偉. 蜂毒多肽對 BVI-2 對 T 細胞及 THP-1 細胞功能的影響. 中國免疫學雜誌 2000.
- [59] 楊順益. 蜂針對關節滑膜細胞因子基因表達的研究. 2002.
- [60] 李萬瑤. 蜂針對關節炎動物的研究. 中國中醫基礎醫學雜誌 2001.
- [61] Yang, J. S., Chen, G. W., Hsia, T. C., Ho, H. C., Ho, C. C., Lin, M. W., Lin, S. S., Yeh, R. D., Ip, S. W., Lu, H. F., Chung, J. G. Diallyl disulfide induces apoptosis in human colon cancer cell line (COLO 205) through the induction of reactive oxygen

species, endoplasmic reticulum stress, caspases cascade and mitochondrial-dependent pathways. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(1): 171-179.

[62] Kumar, S., Vaux, D. L. Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage. *Science* 2002; 297(5585): 1290-1291.

[63] Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., Green, D. R. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 1995; 270(12): 6425-6428.

[64] Sun, F., Kanthasamy, A., Song, C., Yang, Y., Anantharam, V., Kanthasamy, A. G. Proteasome inhibitor-induced apoptosis is mediated by positive feedback amplification of PKC δ proteolytic activation and mitochondrial translocation. *J Cell Mol Med* 2008; 12(6A): 2467-2481.

[65] Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebbersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397(6718): 441-446.

[66] Chose, O., Sarde, C. O., Gerbod, D., Viscogliosi, E., Roseto, A. Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria. *Trends Parasitol* 2003; 19(12): 559-564.

[67] Adams, J. M., Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381): 1322-1326.

[68] Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., Korsmeyer, S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 2003; 300(5616): 135-139.

[69] Kumarswamy, R., Chandna, S. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* 2009; 9(1): 1-8.

[70] Li, L., Han, W., Gu, Y., Qiu, S., Lu, Q., Jin, J., Luo, J., Hu, X. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res* 2007; 67(10): 4894-4903.

[71] Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Marse, B., Kroemer, G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 384(1): 53-57.

[72] Jin, H. S., Lee, D. H., Kim, D. H., Chung, J. H., Lee, S. J., Lee, T. H. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1782-1791.

[73] Millan, A., Huerta, S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer. *J Surg Res* 2009; 151(1): 163-170.

- [74] Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15(12): 1857-1864.
- [75] Wolfson. The Wolfson Institute for Biomedical Research 2007.
- [76] Wilson, N. S., Dixit, V., Ashkenazi, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 2009; 10(4): 348-355.
- [77] Rao, R. V., Bredesen, D. E. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(6): 653-662.
- [78] Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2656-2664.
- [79] Wu, J., Kaufman, R. J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 2006; 13(3): 374-384.
- [80] Bernales, S., McDonald, K. L., Walter, P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2006; 4(12): e423.
- [81] Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004; 165(3): 347-356.
- [82] Qi, X., Tang, J., Pramanik, R., Schultz, R. M., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Han, J., Chen, G. p38 MAPK activation selectively induces cell death in K-ras-mutated human colon cancer cells through regulation of vitamin D receptor. *J Biol Chem* 2004; 279(21): 22138-22144.
- [83] Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., Ron, D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; 18(24): 3066-3077.
- [84] Kim, I., Xu, W., Reed, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(12): 1013-1030.
- [85] Roderick, H. L., Cook, S. J. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 361-375.
- [86] Rodriguez-Mora, O. G., Lahair, M. M., Evans, M. J., Kovacs, C. J., Allison, R. R., Sibata, C. H., White, K. S., McCubrey, J. A., Franklin, R. A. Inhibition of the CaM-kinases augments cell death in response to oxygen radicals and oxygen radical inducing cancer therapies in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(8): 1022-1030.

- [87] Mitra, P., Ghule, P. N., van der Deen, M., Medina, R., Xie, R. L., Holmes, W. F., Ye, X., Nakayama, K. I., Harper, J. W., Stein, J. L., Stein, G. S., van Wijnen, A. J. CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220NPAT and HiNF-P. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 438-448.
- [88] Bene, A., Chambers, T. C. p21 functions in a post-mitotic block checkpoint in the apoptotic response to vinblastine. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(2): 211-217.
- [89] Poon, R. T., Ng, I. O., Lau, C., Zhu, L. X., Yu, W. C., Lo, C. M., Fan, S. T., Wong, J. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg* 2001; 233(2): 227-235.
- [90] Michalak, E., Villunger, A., Erlacher, M., Strasser, A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3): 786-798.
- [91] Yuan, J., Yankner, B. A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407(6805): 802-809.
- [92] Wang, Z., Qi, Y., Chen, Q., Yang, D., Tang, S., Jin, X., Gao, J., Fu, J., Zhou, Z., Wang, J., Xiao, X. Cyclin A is essential for the p53-modulated inhibition from benzo(a)pyrene toxicity in A549 cells. *Toxicology* 2009; 256(1-2): 1-6.
- [93] Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148(7): 2207-2216.
- [94] Luo, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009; 136(5): 823-837.
- [95] Hulleman, E., Boonstra, J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(1): 80-93.
- [96] Trimarchi, J. M., Lees, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1): 11-20.
- [97] Gupta, G. P., Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679-695.
- [98] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-444.
- [99] Ala-aho, R., Kahari, V. M. Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005; 87(3-4): 273-286.
- [100] Ip, S. W., Wei, H. C., Lin, J. P., Kuo, H. M., Liu, K. C., Hsu, S. C., Yang, J. S., Mei, D., Chiu, T. H., Han, S. M., Chung, J. G. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer Res* 2008; 28(2A): 833-842.
- [101] Huang, S. P., Chen, J. C., Wu, C. C., Chen, C. T., Tang, N. Y., Ho, Y. T., Lo, C.,

Lin, J. P., Chung, J. G., Lin, J. G. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res* 2009; 29(1): 165-174.

[102] Lin, S. S., Huang, H. P., Yang, J. S., Wu, J. Y., Hsai, T. C., Lin, C. C., Lin, C. W., Kuo, C. L., Gibson Wood, W., Chung, J. G. DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett* 2008.

[103] Lu, H. F., Yang, J. S., Lai, K. C., Hsu, S. C., Hsueh, S. C., Chen, Y. L., Chiang, J. H., Lu, C. C., Lo, C., Yang, M. D., Chung, J. G. Curcumin-Induced DNA Damage and Inhibited DNA Repair Genes Expressions in Mouse-Rat Hybrid Retina Ganglion Cells (N18). *Neurochem Res* 2009.

[104] Hsiao, Y. P., Huang, H. L., Lai, W. W., Chung, J. G., Yang, J. H. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci* 2009.

[105] Lee, J. H., Lu, H. F., Wang, D. Y., Chen, D. R., Su, C. C., Chen, Y. S., Yang, J. H., Chung, J. G. Effects of tamoxifen on DNA adduct formation and arylamines N-acetyltransferase activity in human breast cancer cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004; 115-116:217-233.

[106] Lu, H. F., Hsueh, S. C., Yu, F. S., Yang, J. S., Tang, N. Y., Chen, S. C., Chung, J. G. The role of Ca²⁺ in (-)-menthol-induced human promyelocytic leukemia HL-60 cell death. *In Vivo* 2006; 20(1): 69-75.

[107] Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7): 517-529.

[108] Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131(6): 1047-1058.

[109] Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., Lechleiter, J. D. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008; 46(3): 143-151.

[110] Hsia, T. C., Yang, J. S., Chen, G. W., Chiu, T. H., Lu, H. F., Yang, M. D., Yu, F. S., Liu, K. C., Lai, K. C., Lin, C. C., Chung, J. G. The roles of endoplasmic reticulum stress and Ca²⁺ on rhein-induced apoptosis in A-549 human lung cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29(1): 309-318.

[111] Lu, H. F., Lai, K. C., Hsu, S. C., Lin, H. J., Kuo, C. L., Liao, C. L., Yang, J. S., Chung, J. G. Involvement of Matrix Metalloproteinases on the Inhibition of Cells Invasion and Migration by Emodin in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res* 2009.

[112] Wang, C. L., Ng, T. B., Cao, X. H., Jiang, Y., Liu, Z. K., Wen, T. Y., Liu, F. CLP induces apoptosis in human leukemia K562 cells through Ca²⁺ regulating extracellular-related protein kinase ERK activation. *Cancer Lett* 2009; 276(2): 221-227.

- [113] Chen, Z., Krailo, M. D., Sun, J., Azen, S. P. Range and trend of expected toxicity level (ETL) in standard A + B designs: a report from the Children's Oncology Group. *Contemp Clin Trials* 2009; 30(2): 123-128.
- [114] Wang, W. D., Chen, Z. T., Li, D. Z., Cao, Z. H., Pu, P., Sun, S. L., Shen, X. P. Retraction: Correlation between DNA Repair Capacity in Lymphocytes and Acute Side Effects to Skin during Radiotherapy in Nasopharyngeal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2009.
- [115] Kim, H., Noh, E. K., Lee, E. J., Baek, J. H., Shin, S. J., Park, J. H., Lee, K. H., Min, Y. J. Enhanced bactericidal function by WKYMVm in patients with acute leukemia. *Leuk Res* 2008; 32(5): 717-725.
- [116] Kim, K. W., Shin, Y. S., Kim, K. S., Chang, Y. C., Park, K. K., Park, J. B., Choe, J. Y., Lee, K. G., Kang, M. S., Park, Y. G., Kim, C. H. Suppressive effects of bee venom on the immune responses in collagen-induced arthritis in rats. *Phytomedicine* 2008; 15(12): 1099-1107.
- [117] Raghuraman, H., Chattopadhyay, A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 2007; 27(4-5): 189-223.
- [118] Tu, W. C., Wu, C. C., Hsieh, H. L., Chen, C. Y., Hsu, S. L. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon* 2008; 52(2): 318-329.
- [119] Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M. Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium* 2009.
- [120] Lin, S. Y., Lai, W. W., Ho, C. C., Yu, F. S., Chen, G. W., Yang, J. S., Liu, K. C., Lin, M. L., Wu, P. P., Fan, M. J., Chung, J. G. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res* 2009; 29(1): 327-335.
- [121] Bi, J., Wang, X. B., Chen, L., Hao, S., An, L. J., Jiang, B., Guo, L. Catalpol protects mesencephalic neurons against MPTP induced neurotoxicity via attenuation of mitochondrial dysfunction and MAO-B activity. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(8): 1883-1889.
- [122] Racay, P., Tatarkova, Z., Chomova, M., Hatok, J., Kaplan, P., Dobrota, D. Mitochondrial Calcium Transport and Mitochondrial Dysfunction After Global Brain Ischemia in Rat Hippocampus. *Neurochem Res* 2009.
- [123] Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res* 2009; 681(1): 80-92.
- [124] Widlak, P., Garrard, W. T. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(2): 263-274.
- [125] de Oca, J., Azuara, D., Sanchez-Santos, R., Navarro, M., Capella, G., Moreno,

V., Sola, A., Hotter, G., Biondo, S., Osorio, A., Marti-Rague, J., Rafecas, A. Caspase-3 activity, response to chemotherapy and clinical outcome in patients with colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(1): 21-27.

[126] Cui, Q., Yu, J. H., Wu, J. N., Tashiro, S., Onodera, S., Minami, M., Ikejima, T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3- independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(7): 1057-1066.

[127] Hill, R., Bodzak, E., Blough, M. D., Lee, P. W. p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* 2008; 7(16): 2535-2543.

[128] Zhang, N. N., Mao, W. P., Wei, C. J., Zhou, L., Liu, H. Y., Feng, J. [Influence of cadmium on structure and functions of mitochondria in hepatic cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88(19): 1350-1353.

[129] Egger, L., Schneider, J., Rhome, C., Tapernoux, M., Hacki, J., Borner, C. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ* 2003; 10(10): 1188-1203.

[130] Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T., Rizzuto, R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 2006; 175(6): 901-911.

[131] Sun, J., Li, Z. M., Hu, Z. Y., Lin, X. B., Zhou, N. N., Xian, L. J., Yang, D. J., Jiang, W. Q. ApoG2 inhibits antiapoptotic Bcl-2 family proteins and induces mitochondria-dependent apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19(10): 967-974.

[132] Okumura, K., Huang, S., Sinicrope, F. A. Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24): 8132-8142.

[133] Perrelet, D., Perrin, F. E., Liston, P., Korneluk, R. G., MacKenzie, A., Ferrer-Alcon, M., Kato, A. C. Motoneuron resistance to apoptotic cell death in vivo correlates with the ratio between X-linked inhibitor of apoptosis proteins (XIAPs) and its inhibitor, XIAP-associated factor 1. *J Neurosci* 2004; 24(15): 3777-3785.

[134] Comelli, M., Genero, N., Mavelli, I. Caspase-independent apoptosis in Friend's erythroleukemia cells: role of mitochondrial ATP synthesis impairment in relocation of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *J Bioenerg Biomembr* 2009; 41(1): 49-59.

[135] Green, D. R., Evan, G. I. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1(1): 19-30.

[136] Gudermann, T., Roelle, S. Calcium-dependent growth regulation of small cell lung cancer cells by neuropeptides. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(4): 1069-1084.

[137] Korosec, B., Glavac, D., Rott, T., Ravnik-Glavac, M. Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 171(2): 105-111.

[138] Li, S., Jiao, J., Lu, Z., Zhang, M. An essential role for N-cadherin and beta-catenin for progression in tongue squamous cell carcinoma and their effect on invasion and metastasis of Tca8113 tongue cancer cells. *Oncol Rep* 2009; 21(5): 1223-1233.

